



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

CARINA MARCONI GERMER

ELETROCARDIOGRAMA, MOVIMENTO CONTRÁTIL CARDÍACO E FREQUÊNCIA
CARDÍACA DA LAGARTIXA, *Hemidactylus mabouia* (Moreau de Jonnés, 1818)

CAMPINAS
2016

CARINA MARCONI GERMER

ELETROCARDIOGRAMA, MOVIMENTO CONTRÁTIL CARDÍACO E FREQUÊNCIA
CARDÍACA DA LAGARTIXA, *Hemidactylus mabouia* (Moreau de Jonnès, 1818)

*Dissertação apresentada à Faculdade
de Engenharia Elétrica e de
Computação da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
Mestra em Engenharia Elétrica, na Área
de concentração de Engenharia
Biomédica*

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ WILSON MAGALHÃES BASSANI

Coorientadora: Profa. Dra. ROSANA ALMADA BASSANI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
CARINA M. GERMER, E ORIENTADA PELO PROF.
DR. JOSÉ W. M. BASSANI E COORIENTADA PELA
PROFA. DRA. ROSANA A. BASSANI

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 134262/2014-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Elizangela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

G317e Germer, Carina Marconi, 1990-
Eletrocardiograma, movimento contrátil cardíaco, e frequência cardíaca da lagartixa, *Hemidactylus mabouia* (Moreau de Jonnès, 1818) / Carina Marconi Germer. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: José Wilson Magalhães Bassani.

Coorientador: Rosana Almada Bassani.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Lagartixa - Fisiologia. 2. Réptil. 3. Frequência cardíaca. 4. Eletrocardiograma. I. Bassani, José Wilson Magalhães, 1953-. II. Bassani, Rosana Almada, 1955-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Electrocardiogram, heart movement and heart rate in the gecko (*Hemidactylus mabouia*, Moreau de Jonnès, 1818)

Palavras-chave em inglês:

Gecko - Physiology

Small reptile

Heart rate

Electrocardiogram

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Mestra em Engenharia Elétrica

Banca examinadora:

José Wilson Magalhães Bassani [Orientador]

Augusto Shinya Abe

Leonardo Abdala Elias

Data de defesa: 20-01-2016

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA - DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Candidato: Carina Marconi Germer RA: 086305

Data da Defesa: 20 de janeiro de 2016

Título da Tese: “Eletrocardiograma, movimento contrátil cardíaco e frequência cardíaca da lagartixa, *Hemidactylus mabouia* (Moreau de Jonnès, 1818)”.

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani (Presidente, FEEC/UNICAMP)

Prof. Dr. Augusto Shinya Abe (IB – UNESP/Rio Claro)

Prof. Dr. Leonardo Abdala Elias (FEEC/UNICAMP)

A ata de defesa, com as respectivas assinaturas dos membros da Comissão Julgadora, encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

*"O reconhecimento da própria ignorância
é a primeira prova de inteligência."*

Santo Agostinho

*Dedico este trabalho
aos meus pais, Silvia e Alex,
meus maiores exemplos.*

Agradecimentos

Aos meus pais, Sílvia e Alex, meus conselheiros, pelo carinho, incentivo, suporte e educação.

Aos meus orientadores Prof. José Bassani e Profa. Rosana Bassani, que são para mim como “pais acadêmicos”. Não tenho palavras para expressar minha gratidão pelos anos de ensino, apoio, paciência e amizade, fundamentais para meu amadurecimento acadêmico.

Aos membros da banca Prof. Augusto Abe, Prof. Leonardo Abdala, Prof. Luiz Passos e Prof. Pedro Xavier, pelas sugestões e críticas para a melhoria deste projeto.

Aos professores do Departamento de Engenharia Biomédica, em especial aos professores Pedro Xavier e Leonardo Abdala pela amizade, conselho e suporte na realização deste trabalho.

À secretária e amiga Ana Lúcia Ferreira Sastre, e aos funcionários e técnicos do Centro de Engenharia Biomédica, em especial ao Carlos Alberto Lourenço, Mauro Sérgio Martinazo, Renato da Silva Moura e Elisângela Couto Oliveira.

À Profa. Dra. Juliana M. Tomaz e Profa. Dra. Ana F. Carvalho pela parceria neste projeto.

Quero acrescentar meu agradecimento ao meu irmão Guilherme, pelo exemplo de constante dedicação e *amor à sabedoria*. À Natália, minha cunhada, pelo carinho, conselho e ombro amigo.

A todos os amigos da graduação e da pós-graduação na FEEC que foram responsáveis por muitos momentos de alegria, e que sempre me deram suporte nos momentos difíceis. Em especial, agradeço a amizade de Jair Trapé Goulart e carinho e companheirismo de Fernando Andrade.

Ao Prof. Yaro Burian, meu exemplo de Professor-Engenheiro, e companheiro musical, e a todos os professores da FEEC.

Termino com o agradecimento, não menos importante, ao CNPq pelo financiamento da bolsa de pesquisa.

Resumo

É amplo o conhecimento sobre morfologia e função do coração de mamíferos, porém, com relação ao coração de répteis, ainda há relativamente pouca informação que permita melhor compreensão e comparação de suas características entre as diferentes ordens desta classe, bem como com as demais classes de vertebrados. O objetivo deste trabalho foi a obtenção da frequência cardíaca (FC) da lagartixa (*Hemidactylus mabouia*, Moreau de Jonnès, 1818) a partir de registros de eletrocardiograma (ECG). Foi desenvolvido um amplificador de biopotenciais com alto ganho, e alta impedância de entrada, cujos registros permitiram a caracterização da morfologia do ECG e a estimativa da FC em animais não anestesiados, a qual foi comparada em três condições experimentais: imobilização manual (IM) e imobilização tônica (IT), provavelmente associadas à indução de *stress*, e sem restrição física (SR; em repouso). O registro de ECG da lagartixa mostrou a presença das ondas P, R, S e T, com polaridade semelhantes daquelas observadas em mamíferos. Isto pode indicar semelhança no trajeto geral da onda de ativação elétrica, embora um sistema de condução organizado não tenha sido descrito em répteis. A FC foi mais elevada em IM ($2,90 \pm 0,12$ Hz; $p < 0,05$) do que nas condições IT ($1,52 \pm 0,10$ Hz) e SR ($1,52 \pm 0,13$ Hz). Entretanto, o coeficiente de variação do intervalo R-R (índice de variabilidade da frequência cardíaca) foi significativamente maior em SR ($p < 0,05$), como esperado numa situação próxima ao repouso. A observação do comportamento do animal permitiu desenvolver abordagens para registro do ECG nas condições de *stress* e repouso. De acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro relato desta natureza em répteis de pequeno porte.

Palavras-chave: lagartixa, réptil, frequência cardíaca, amplificador de biopotenciais, instrumentação, eletrocardiograma.

Abstract

Although much is known on cardiac morphology and physiology in mammals, relatively little information is available on the reptilian heart, as to allow a better understanding and comparison of the cardiac morphological and functional aspects among *Reptilia* orders and with other *Vertebrata* classes. The goal of this study was to obtain *in vivo* heart rate (HR) values in geckos (*Hemidactylus mabouia*, Moreau de Jonnès, 1818) from electrocardiogram (ECG) records. A high-gain, high-input impedance biopotential amplifier was developed, as to allowed characterization of the ECG morphology and HR estimation in non-anesthetized animals under the following experimental conditions: manual restraint (MR) and tonic immobilization (TI), which are expected to be associated with induction of stress reaction, and non-restrained (NR; under rest). The ECG signal from geckos showed P, R, S and T waves, which presented polarity similar to those observed in mammals. This may indicate similarity in the main trajectory of the electrical activation wave in the ventricles, although an organized electrical conduction system has not yet been described in reptilian hearts. HR was higher under MR (2.90 ± 0.12 Hz; $p < 0.05$) than under TI (1.52 ± 0.10 Hz) and NR (1.52 ± 0.13 Hz). Nevertheless, the coefficient of variation of the R-R interval (an index of HR variability) was significantly greater under NR ($p < 0.05$), as expected in non-stressed animals. The prior behavioral observation allowed the development of experimental approaches for ECG recording under resting and stressful conditions. According to our knowledge, this is the first report of this kind of data in small reptiles.

Lista de Ilustrações

Figura 1 -	13
Figura 2 -	14
Figura 3 -	15
Figura 4 –	19
Figura 5 -	20
Figura 6 -	21
Figura 7 –	23
Figura 8 –	24
Figura 9 –	26
Figura 10 -	27
Figura 11 -	28
Figura 12 -	28
Figura 13 -	32
Figura 14 -	33
Figura 15 -	34
Figura 16 –	35
Figura 17 -	36
Figura 18 -	37
Figura 19 -	37
Figura 20 -	38
Figura 21 -	39
Figura 22 -	39
Figura 23 -	40
Figura 24 -	42
Figura 25 –	43
Figura 26 -	45
Figura 27 -	46
Figura 28 -	48
Figura 29 –	48
Figura 30 -	49
Figura 31 –	50
Figura 32 -	50
Figura 33 –	55

Lista de abreviaturas e siglas

AEC – acoplamento excitação-contração

bpm – batimentos por minuto

CA – compartimento arterial

CAV – canal atrioventricular

CI – circuito integrado

CMRR - rejeição de modo comum

CP – compartimento pulmonar

CRM – circuito de retorno da malha

CV – compartimento venoso

CV_{RRI} - coeficiente de variação da série RRI

DC – débito cardíaco

DP – desvio padrão

ECG – eletrocardiograma

EPM – erro padrão da média

FC - frequência cardíaca

H – vetor do coração

IM - imobilização manual

i_m – corrente transmembrana

IT - imobilidade tônica

LDR - resistor dependente de luz

MC - movimento contrátil cardíaco

NAV – nódulo atrioventricular

PA – potencial de ação

PVC – polivinil carbono

RRI - intervalo RR instantâneo

RS – retículo sarcoplasmático

SR - sem restrição física

VFC – variabilidade da frequência cardíaca

V_m – potencial transmembrana

VPOD - velocidade de propagação da onda de despolarização

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 MORFOFISIOLOGIA DO CORAÇÃO DE RÉPTEIS	13
1.2 ELETROCARDIOGRAMA	20
2. OBJETIVOS.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 ANIMAIS	31
3.2 AMPLIFICADOR DE BIOPOTENCIAIS	31
3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	38
3.4 ANÁLISE DOS DADOS.....	41
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4. RESULTADOS	45
4.1 ESTIMATIVA DA FC A PARTIR DO REGISTRO ELETROCARDIOGRÁFICO	45
4.2 ESTIMATIVA DA FC A PARTIR DO REGISTRO DO MOVIMENTO CARDÍACO.....	49
4.3 PARÂMETROS TEMPORAIS DERIVADOS DO ECG	49
5. DISCUSSÃO	51
5.1 ECG DA LAGARTIXA	51
5.2 FC NAS TRÊS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	56
5.3 CV NAS TRÊS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	58
6. CONCLUSÕES	59
7. REFERÊNCIAS.....	60
8. AUTORIZAÇÕES	66
9. LISTA DE PUBLICAÇÕES	74

1. Introdução

A lagartixa (*Hemidactylus mabouia*, Moreau de Jonnès, 1818) pertence à ordem dos escamados (*Squamata*) da classe *Reptilia*. Esta ordem compreende um grupo muito diverso, com mais de 7000 espécies (Jensen et al., 2014), incluindo animais da subordem *Anfisbena* (cobras cegas), lagartos e serpentes. O coração dos escamados tem sido objeto de estudos anatômicos e funcionais não só para melhor compreensão da fisiologia circulatória de répteis desta ordem, mas também para comparação entre ramos taxonômicos (Figura 1). Por exemplo, muitos estudos indicam que o coração com quatro câmaras dos mamíferos e aves evoluiu independentemente do coração de três câmaras dos répteis. Porém, alguns estudos indicam uma possível conexão evolutiva (Jensen et al., 2013a). Considera-se que os répteis possam ter uma posição filogenética central para o entendimento da transição, tanto funcional, quanto anatômica, do sistema cardiovascular durante a evolução dos mamíferos a partir dos peixes (Jensen et al., 2014). Nas últimas décadas, tem crescido o interesse no estudo de répteis, pois ainda há muito para ser compreendido.

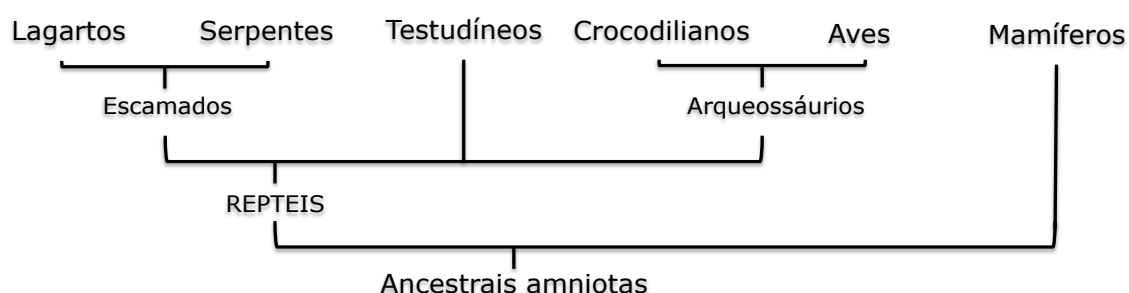


Figura 1 - Árvore filogenética da evolução dos vertebrados amniotas. Modificado de JENSEN et al., 2013a.

1.1 Morfofisiologia do Coração de Répteis

Anatomia

O coração dos escamados é envolto por um pericárdio e geralmente está localizado na linha mediana do tórax. O miocárdio é formado majoritariamente por tecido esponjoso trabecular, que corresponde a 80% da massa ventricular. Ao redor do miocárdio esponjoso do ventrículo, há duas ou três finas camadas corticais de miocárdio compacto. Estas camadas são supridas por artérias coronárias, enquanto

a parte esponjosa é banhada com o sangue que está no lúmen da câmara ventricular (Germer et al., 2015; Jensen et al., 2014). A Figura 2 ilustra a histologia do coração da lagartixa, e, na Figura 2D, é possível observar as camadas esponjosa e compacta no ventrículo.

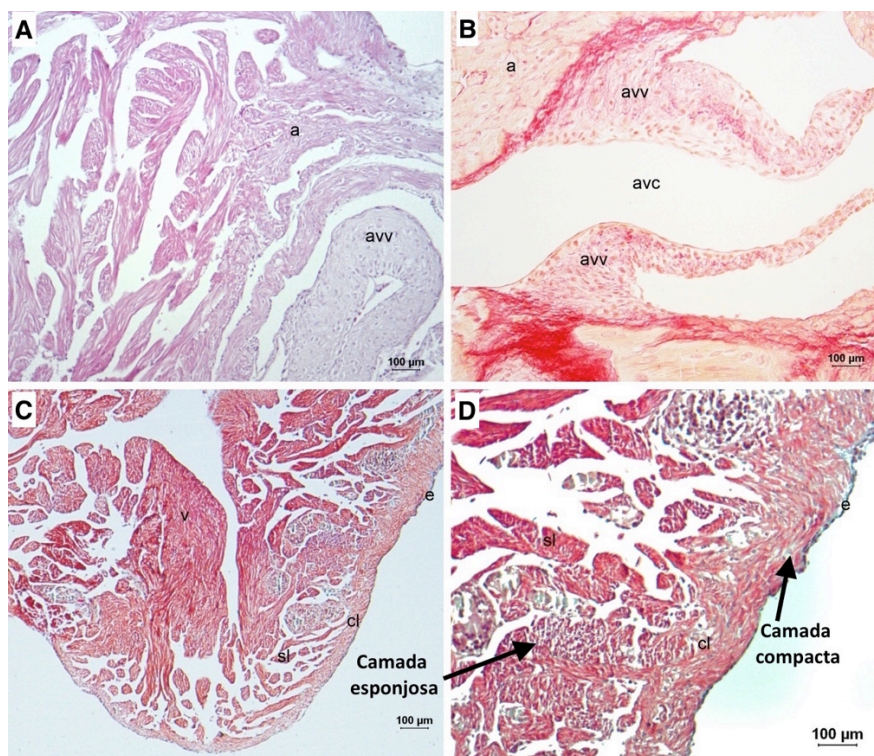


Figura 2 - Seções longitudinais do coração da lagartixa (*Hemidactylus mabouia*). A: átrio esquerdo; B: válvula atrioventricular; C e D: ventrículo. Átrio (a), ventrículo (v), válvula atrioventricular (avv), canal atrioventricular (avc), epicárdio (e), camada compacta (cl), camada esponjosa (sl). (Germer et al., 2015). Licença para reprodução da imagem cedido por Springer: 3626680747431.

O coração dos escamados é composto de dois átrios e um ventrículo parcialmente septado em três compartimentos. Os compartimentos à esquerda, central e à direita são, respectivamente, os compartimentos arterial (CA), venoso (CV) e pulmonar (CP). O CA é parcialmente separado do CV por uma agregação trabecular chamada septo vertical, enquanto que o CV é parcialmente separado do CP por um septo espiral chamado de crista muscular (Jensen et al., 2013a; Wyneken, 2009).

Sobre o átrio direito, situa-se o seio venoso, que é uma câmara que recebe sangue de quatro veias sistêmicas: as veias cavas anteriores direita e esquerda, veia cava posterior e veia coronária. Durante a diástole, o sangue do átrio direito, vindo do seio venoso, entra no CV, enquanto que o sangue do átrio esquerdo, vindo de uma ou duas veias pulmonares, entra no CA. O sangue rico em

oxigênio no compartimento arterial passa sobre a crista do septo vertical e flui ao lado do sangue do CV. Este sangue é direcionado preferencialmente para a aorta direita, a qual dá origem às artérias carótidas que vão para a circulação cerebral, e para a circulação sistêmica via aorta esquerda. O sangue vindo do átrio direito para o CV é direcionado ao CP e transportado pela artéria pulmonar. As três saídas do sangue (aortas esquerda e direita, e artéria pulmonar) estão organizadas em um único tronco septado (Jensen et al., 2013a, 2014). O esquema do fluxo sanguíneo no coração de um réptil da ordem dos escamados está ilustrado na Figura 3.

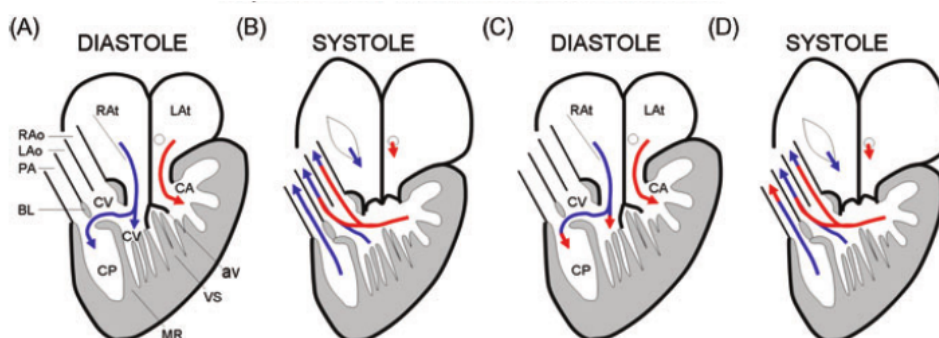


Figura 3 - Esquema do fluxo sanguíneo no coração dos escamados durante a diástole (A e C) e a sístole (B e D). Compartimentos venoso (CV), pulmonar (CP) e arterial (CA); átrios direito (RAi) e esquerdo (LAi); aortas direita (RAo) e esquerda (LAo); artéria pulmonar (PA); válvula atrioventricular (av); septo vertical (vs); crista muscular (MR); *bulbuslamelle* (BL) (Jensen et al., 2014). Licença para reprodução da imagem cedida por John Wiley and Sons: 3626681316524.

Nota-se na Figura 3 a divisão do ventrículo nos CA, CV e CP, separados pelo septo vertical e crista muscular. Durante a diástole, há um pequeno espaço entre a crista muscular e o *bulbuslamelle* que possibilita a passagem do sangue entre os CV e CP. Enquanto a crista muscular é uma estrutura estática durante todo o ciclo cardíaco, o *bulbuslamelle* se contrai durante a sístole e se aproxima da crista muscular. O estreitamento resultante separa o CP do CV, porém ele permite a passagem do sangue caso haja diferença de pressão entre os compartimentos. O septo vertical separa parcialmente o CV do CA. A região por onde o sangue flui do CA para o CV, por cima do septo vertical, é chamado de canal intraventricular, mas ele não é anatomicamente identificável (Jensen et al., 2014).

A mistura do sangue no CV (Figura 3) ocorre devido a *shunts* intracardíacos, que podem ser do tipo *wash-out*, ou *shunt* de pressão. O primeiro é o redirecionamento do sangue para o mesmo circuito devido à separação incompleta do ventrículo. Uma parcela do sangue venoso que flui através do CV para o CP permanece no primeiro compartimento, e, durante a sístole, é redirecionada para a circulação sistêmica (*shunt* direita-esquerda). Por outro lado, o sangue arterial que

permanece no CV pode ser direcionado para o CP, retornando à circulação pulmonar (*shunt* esquerda-direita) (Wang et al., 2001a).

O *shunt* de pressão depende do fechamento incompleto do estreitamento da crista muscular com o *bulbuslamelle* durante a sístole ventricular, e do gradiente de pressão através desta abertura. Estes, por sua vez, dependem do grau de desenvolvimento da crista muscular, da contratilidade cardíaca e da diferença das resistências de saída entre as circulações pulmonar e sistêmica (Hicks, 1994; Wang et al., 2001a). Animais com crista muscular bem desenvolvida, como as cobras píton e alguns lagartos, apresentam separação completa do CP e CV durante a sístole. Nestes animais, a participação relativa do *shunt* de pressão é muito menor do que o do *shunt wash-out* (Wang et al., 2003).

A resistência de saída da circulação pulmonar é controlada pelo tônus motor do esfíncter da artéria pulmonar, que depende do tônus eferente vagal. O animal em repouso apresenta um alto tônus vagal, o que causa constrição deste esfíncter, resultando em baixo fluxo sanguíneo pulmonar e predominância do *shunt* direita-esquerda. Quando o metabolismo aumenta, há diminuição do tônus vagal, e, consequentemente, relaxamento do esfíncter. Isto faz com que a resistência de saída da circulação pulmonar seja reduzida, o que diminui o gradiente de pressão entre as saídas para os circuitos pulmonar e sistêmico. A diminuição do tônus vagal, portanto, reduz o *shunt* direita-esquerda, e, em alguns animais, pode haver uma troca de direcionamento para o *shunt* esquerda-direita (Hicks, 1994; Wang et al., 2001a). Além da regulação vagal, pode haver regulação adrenérgica do gradiente de pressão entre as saídas para os circuitos, que é reduzida pela indução da vasoconstrição sistêmica por catecolaminas (Galli et al., 2007).

Atividade Elétrica Cardíaca

A atividade elétrica cardíaca se inicia nas células marca-passo do seio venoso, e se propaga consecutivamente pelos átrios e ventrículos até o cone arterial (*conus arteriosus*), que está situado na base das grandes artérias (Jensen et al., 2014; Moorman and Christoffels, 2003). Há discrepância no sentido de condução da atividade elétrica ventricular relatado em animais ectotérmicos, de propagação na direção base-ápice ventricular (Jensen et al., 2012; Mullen, 1967), ou na direção oposta (Moorman and Christoffels, 2003; Sedmera et al., 2003). No entanto, não há

evidencia anatômica de um sistema especializado de condução elétrica cardíaca em vertebrados ectotérmicos (Sedmera et al., 2003; Šolc, 2007; Wyneken, 2009).

O processo de formação do coração nas classes dos vertebrados é muito semelhante, e os primeiros estágios de desenvolvimento cardíaco em embriões de mamíferos e aves se assemelham àqueles em répteis adultos (Christoffels et al., 2010; Jensen et al., 2014). Durante a formação das câmaras cardíacas em vertebrados, a ativação elétrica do ventrículo se inicia no canal atrioventricular (CAV) e termina no ápice ventricular (Jensen et al., 2012; Sedmera et al., 2004). Em alguns répteis, o sentido da ativação elétrica ventricular é mantido posteriormente, enquanto que em mamíferos e aves ele é invertido (Jensen et al., 2012). Isto ocorre devido ao desenvolvimento de um sistema organizado de rápida condução elétrica nestes animais. Um dos componentes deste sistema é o feixe de His, que é formado da crista do septo ventricular em desenvolvimento (Christoffels et al., 2010), e é o responsável pela rápida condução do impulso elétrico do nódulo atrioventricular (desenvolvido do CAV) para o ápice do ventrículo. O impulso é então propagado dos ramos deste feixe para a rede de fibras de Purkinje, que se localiza na parede endocárdica ventricular (Christoffels and Moorman, 2009; Truex and Smythe, 1965). Este sistema de rápida condução elétrica é ausente nos vertebrados ectotérmicos (Jensen et al., 2013b; Šolc, 2007).

A propagação elétrica no coração depende do formato da célula (a velocidade de condução numa única célula é proporcional ao seu diâmetro), do padrão de distribuição dos canais de junção *gap*, e dos tipos e abundância de canais iônicos presentes na membrana (Kléber and Rudy, 2004; Spach et al., 2004). Cada célula contribui com um conexon (hemicanal) para formar o canal que acopla eletricamente as membranas de células adjacentes nas junções *gap*. Os conexons são formados por conexinas, proteínas que apresentam diferentes isoformas, entre elas Cx40, Cx43, Cx30.2 e Cx45. As duas primeiras formam canais com maior condutância do que as demais, o que permite propagação elétrica mais rápida. As conexinas de alta condutância são expressas nos átrios e ventrículos, enquanto que as de baixa condutância são encontradas no seio venoso e no canal atrioventricular (Jansen et al., 2010; Meens et al., 2015; Temple et al., 2013). Foi encontrada expressão de Cx40 nos átrios e ventrículos de lagartos do gênero *Anolis*, e ausência desta isoforma de conexina no CAV, o que poderia explicar a maior velocidade de

condução no miocárdio atrial e ventricular do que no CAV, uma vez que não foi encontrado tecido conjuntivo neste canal, o qual poderia contribuir para algum grau de isolamento elétrico (Jensen et al., 2012)

Nos vertebrados ectotérmicos, há um atraso substancial da condução elétrica na região atrioventricular. Este atraso pode ser devido: a) ao menor diâmetro dos miócitos, comparados àquele nos átrios e ventrículos; b) à presença de tecido conjuntivo; e/ou, c) a um baixo nível de expressão de canais de Na^+ , que poderia resultar em menor excitabilidade celular (Temple et al., 2013). Além disso, os miócitos desta região parecem ser menos diferenciados, e se assemelham a miócitos embrionários, que apresentam poucas mitocôndrias, bem como miofibrilas e retículo sarcoplasmático (RS) pouco desenvolvidos (Christoffels et al., 2010).

Atividade Metabólica e Frequência Cardíaca

A taxa metabólica dos répteis é aproximadamente dez vezes menor do que a de mamíferos e aves. Estudos indicam a existência de uma relação alométrica entre a massa corporal e a taxa metabólica nos vertebrados (White et al., 2006). Foi também identificada uma relação negativa entre a frequência cardíaca (FC) e a massa corporal de mamíferos (Lindstedt and Schaeffer, 2002; West et al., 1997) e cobra píton (Enok et al., 2014), mas não em peixes (Clark and Farrell, 2011). Pouco se conhece sobre esta possível relação em répteis, principalmente da ordem dos escamados (Lillywhite et al., 1999). São escassos os dados sobre a FC em répteis de pequeno porte (< 10 g), como é o caso da lagartixa, objeto do presente estudo. Além disso, pode-se observar na Figura 4 que há uma extensa faixa da FC para uma dada massa corporal. Por exemplo, para uma massa corporal de 10 g, a faixa da FC de mamíferos pode variar entre 200 e 1300 batimentos por minuto (bpm), enquanto que para peixes, anfíbios e répteis, a FC varia entre 100 e 300 bpm. Porém, na maioria dos animais ectotérmicos, a FC máxima não é superior a 120 bpm (Farrell, 1991), com exceção de lagartos pequenos (< 100 g) com temperatura corporal de 35-43 °C, nos quais a FC pode ultrapassar 300 bpm (Lillywhite et al., 1999).

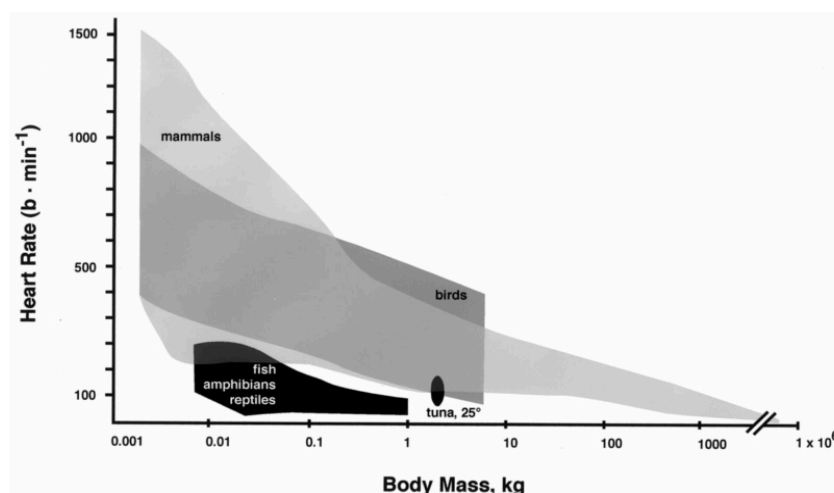


Figura 4 – Faixas de variação da frequência cardíaca em relação com a massa corporal em diferentes vertebrados (mamíferos, aves, peixes, anfíbios e répteis) (Lillywhite et al., 1999). Licença para reprodução da imagem cedida pela Elsevier: 3626690131766.

A FC de um animal ectotérmico, é altamente influenciada por diversos fatores, como temperatura corporal, atividade metabólica, trocas gasosas, pH dos líquidos corporais, postura corporal e regulação reflexa da pressão sanguínea (Lillywhite et al., 1999). Raramente a FC de vertebrados em repouso é igual à frequência intrínseca do marcapasso primário cardíaco, mas resulta da modulação neurohumoral da atividade marcapasso, com influência excitatória adrenérgica e inibitória colinérgica (Lillywhite et al., 1999; Taylor et al., 2014). Germer et al. (2015) relataram, em corações isolados de lagartixa, uma frequência espontânea média de 0,84 Hz, e produção de respostas cronotrópicas positiva e negativa, respectivamente, ao neurotransmissor adrenérgico noradrenalina e ao agonista colinérgico muscarínico carbacol. Respostas semelhantes foram observadas *in vivo* em outros répteis da ordem dos escamados (Galli et al., 2007; Sartori et al., 2015; Wang et al., 2001b).

A diferença entre a alta FC dos mamíferos e aves e a baixa FC dos vertebrados heterotérmicos pode ter relação, do ponto de vista evolutivo, com diversos fatores anatômicos e fisiológicos, como a taxa metabólica corporal e miocárdica, modo de suprimento sanguíneo para o miocárdio, existência de sistema organizado de rápida condução elétrica e mecanismo de acoplamento excitação-contração miocárdico (AEC) (Lillywhite et al., 1999).

A amplitude de contração do miocárdio depende da frequência de estimulação (Blinks and Koch-Weser, 1961). A Figura 5 exhibe esta relação obtida no tecido miocárdico isolado de animais ectotérmicos de diversas espécies, e é

possível notar duas fases claras: uma positiva nas frequências mais baixas, e uma negativa nas frequências mais altas. Na maioria das espécies, o máximo da força desenvolvida ocorre na faixa de FC *in vivo* do animal em repouso (Lillywhite et al., 1999). Diversos estudos indicam que fatores modulatórios do AEC têm importante papel na determinação da relação entre amplitude da contração miocárdica e a frequência estimulatória (Bassani and Bers, 1994; Bers et al., 1993; Hove-Madsen and Gesser, 1989; Maier et al., 2000).

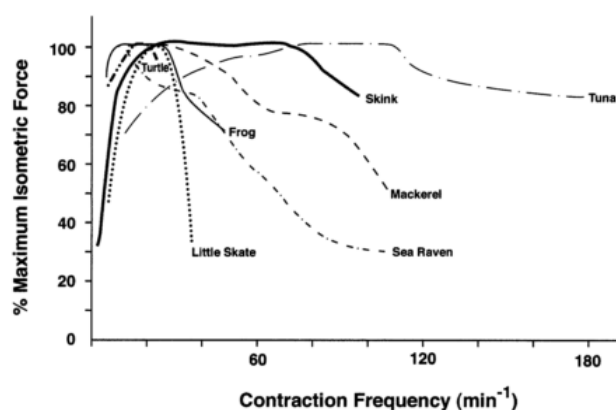


Figura 5 - Relação entre a força desenvolvida (como porcentagem do máximo) e a frequência estimulatória no tecido miocárdico isolado de alguns vertebrados (da esquerda para a direita: tartaruga, raia, rã, lagarto, cavala, corvo do mar e atum) (Lillywhite et al., 1999). Licença para reprodução da imagem cedida pela Elsevier: 3626690131766.

Os mecanismos celulares básicos da relação entre amplitude da contração e a frequência tem sido pouco estudados no miocárdio de animais ectotérmicos, particularmente em répteis (Nielsen and Gesser, 2001; Shiels et al., 2002; Warren et al., 2010; Zaar et al., 2007), e mais estudos são imprescindíveis para maior conhecimento da fisiologia destes animais. Para que se possa realizar experimentos *in vitro* relevantes para a condição fisiológica, é importante que se conheça a faixa da FC do animal. Uma forma de se obter a FC é por meio do registro eletrocardiográfico.

1.2 Eletrocardiograma

O eletrocardiograma (ECG) é o registro da geração e propagação da atividade elétrica do coração feito na superfície do corpo. Esta atividade (potencial de ação, PA) é iniciada nas células auto-excitáveis (marca-passo primário) em regiões supraventriculares, e propagada de célula a célula no miocárdio. No repouso, a face interna da membrana da célula apresenta um potencial elétrico

negativo com relação ao meio externo, denominado potencial de membrana de repouso. Durante o PA, ocorre variação da permeabilidade seletiva da membrana, principalmente ao Na^+ , ao Ca^{2+} e ao K^+ , causada pela abertura de canais de membrana dependentes do potencial elétrico transmembrana (V_m). No repouso, a membrana é mais permeável ao K^+ , portanto, V_m se mantém próximo ao potencial de equilíbrio deste íon (~ -70 a -80 mV em miócitos cardíacos de mamíferos). A Figura 6 mostra a forma de onda do PA (painel A) em miócito ventricular de mamífero, e as principais correntes iônicas de entrada (painel B) e saída (painel C) associadas a ela. Nestas células, a despolarização da membrana leva à abertura de canais seletivos a Na^+ . Devido ao alto gradiente eletroquímico transmembrana deste íon, rapidamente se desenvolve uma corrente de entrada (figura 6B), e o potencial de membrana tende ao potencial de equilíbrio do Na^+ , atingindo valores positivos (fase de despolarização rápida Figura 6A).

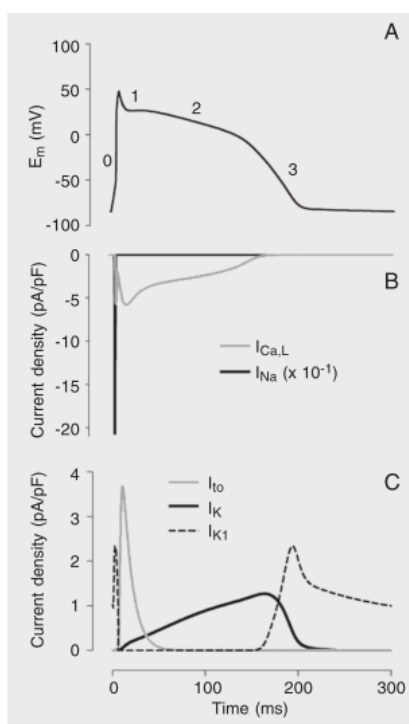


Figura 6 - Potencial de ação e correntes iônicas em miócito ventricular de coelho. A: Potencial de ação nas fases 0 (despolarização rápida), 1 (repolarização parcial), 2 (platô), e 3 (repolarização lenta). B: Correntes iônicas dependentes de potencial que contribuem para a despolarização da membrana. I_{Na} : corrente de Na^+ ; $I_{\text{Ca,L}}$: corrente de Ca^{2+} tipo L. C: Correntes iônicas dependentes de potencial que contribuem para a repolarização da membrana. I_{to} : corrente transitória de saída de K^+ ; I_{K} : conjunto das correntes tardias de K^+ ; I_{K1} : corrente de retificação de entrada de K^+ (Bassani, 2006). Autorização cedida pela autora (Bassani, RA), conforme a licença *Creative Commons Attribution License* utilizada pela revista (Braz J Med Biol Res).

Com a redução do gradiente eletroquímico local, a inativação desses canais e a abertura de canais seletivos a K^+ de cinética rápida de abertura e fechamento, a membrana se repolariza parcialmente (fase de repolarização parcial). Esta fase coincide com o início da abertura de canais de Ca^{2+} , que medeiam uma corrente despolarizante de entrada, e a posterior abertura tardia de canais de K^+ , pelos quais flui uma corrente de saída que tende a levar V_m a valores negativos. Ocorre então a fase do PA em que a taxa de variação de V_m é baixa (platô), em função da coexistência dessas 2 correntes de efeito oposto. Com o tempo, os canais de Ca^{2+} se inativam lentamente, predominando a condutância ao K^+ , e a membrana se repolariza completamente (fase de repolarização final) (Weiss, 1997).

A propagação do PA cardíaco é auto-regenerativa, não só ao longo da membrana da célula, mas também entre células, por meio das vias de baixa resistência representadas pelos canais das junções *gap*. Isto ocorre devido à geração de correntes locais na fronteira entre regiões da membrana (ou células) que se encontram despolarizadas e aquelas ainda em repouso elétrico (polarizadas). As correntes locais causam uma pequena despolarização destas últimas regiões, que, no entanto, é suficiente para promover a abertura de um pequeno número de canais de Na^+ . O influxo do íon, por sua vez, resulta em maior despolarização, o que recruta mais canais, e esta alça de retroalimentação positiva culmina com a abertura síncrona de um número crítico de canais de Na^+ capaz de levar ao disparo de um PA. Portanto, na região excitada da membrana, o fluxo de íons através de canais iônicos resultará em uma corrente transmembrana (i_m). Entretanto, a formulação a seguir, baseada no modelo do cabo condutor, não assume a natureza iônica da i_m .

Considerando-se que a fibra cardíaca está imersa em um grande volume de meio condutor, i_m pode ser calculada em função de V_m (Equação 1), de acordo com o modelo do cabo condutor (Plonsey, 1977; Plonsey and Barr, 2007a) (Figura 7):

$$i_m(x, t) = \pi a^2 \sigma_i \frac{\partial^2 V_m}{\partial x^2} \quad \text{Equação 1}$$

onde i_m é a corrente transmembrana (unidade: A/m), a é o raio do cilindro que representa a célula (unidade: m) e σ_i é a condutividade do meio intracelular (unidade: S/m).

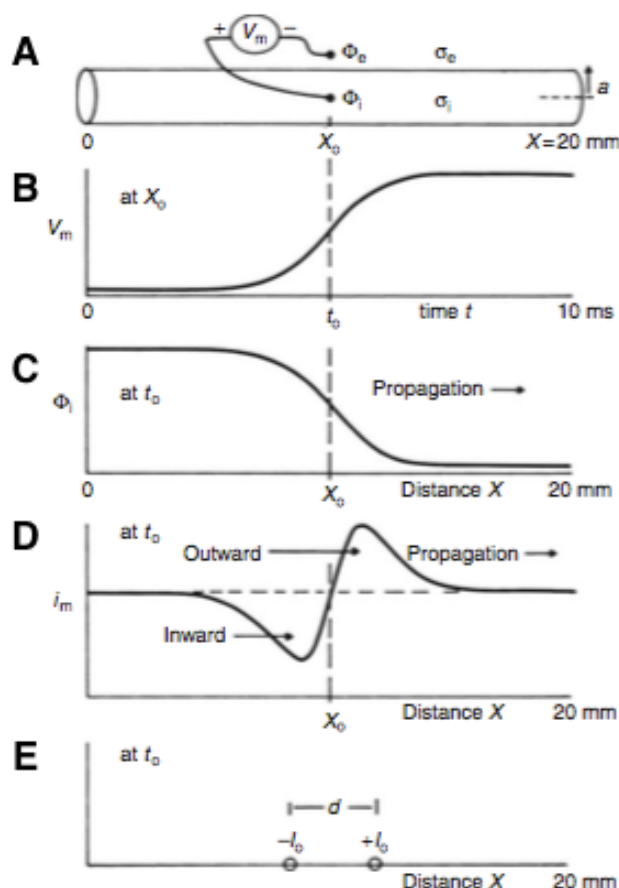


Figura 7 – Potenciais e correntes de membrana durante a fase de despolarização do potencial de ação (PA) que se propaga na direção indicada ao longo de uma célula. (A) Representação da membrana da célula por um cilindro de raio a . O potencial transmembrana (V_m) equivale à diferença entre os potenciais elétricos nos meios intracelular (Φ_i) e extracelular (Φ_e), cuja condutividade é σ_i e σ_e , respectivamente. (B) Variação temporal de V_m estimada na região X_0 do cilindro. Somente está mostrada a fase de despolarização do PA. O tempo t_0 é aquele no qual V_m atinge a metade do seu máximo valor. (C) Valor de Φ_i ao longo da célula no tempo t_0 . (D) Distribuição espacial da corrente transmembrana (i_m) ao longo da célula no tempo t_0 , na qual deflexões positiva e negativa indicam, respectivamente, correntes resultantes de saída e entrada. (E) Representação das correntes de entrada e saída como monopolos carga ($-I_0$) e fonte ($+I_0$), respectivamente (Barr, 2010). Licença para reprodução da imagem cedida pela Springer: 3707810553997.

Observa-se na Figura 7D que, nas regiões próximas à excitada, há correntes positiva (de saída) e negativa (de entrada), que podem ser representadas, respectivamente, como monopolos fonte ($+I_0$) e carga ($-I_0$), (Figura 7E). O gradiente de potencial intracelular (Figura 7C) induz corrente que flui no meio intracelular (Figura 8A), assim como o gradiente de potencial extracelular induz corrente que flui no meio extracelular (Figura 8A).

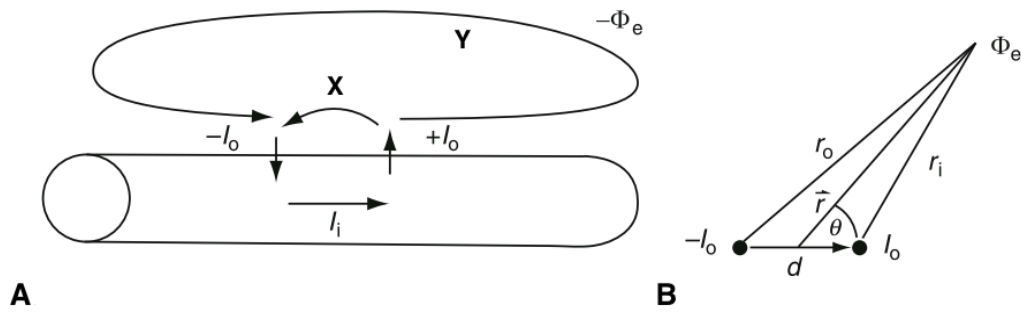


Figura 8 – Padrão do fluxo de corrente na célula durante a despolarização da membrana. (A) Corrente intracelular longitudinal (I_i), correntes transmembrana (I_o), corrente extracelular (X e Y) e potencial elétrico (Φ_e). (B) Φ_e é gerado pelo dipolo elétrico das correntes transmembrana ($-I_o$ e $+I_o$) onde d é a distância entre os monopólos (Barr, 2010). Licença para reprodução da imagem cedida pela Springer: 3707810553997.

O campo elétrico medido em um ponto de observação no meio externo (de condutividade σ_e) distante da fibra cardíaca é gerado pela superposição das correntes de saída e entrada desta fibra (Figura 7D). Como não é possível distinguir o potencial gerado pelas correntes em cada ponto da membrana, considera-se o conjunto das correntes de saída como um único monopolo concentrado, denominado fonte (I_o), e o conjunto das correntes de entrada como um único monopolo concentrado, denominado carga ($-I_o$) (Figura 7E), sendo estes monopólos separados por uma distância d (Figura 8B) (Plonsey and Barr, 2007a). Em medições feitas a distâncias muito maiores do que d , considera-se que o potencial elétrico no meio externo se aproxima daquele gerado por um único dipolo formado pelos monopólos concentrados, localizado na região central da fibra, conforme modelo mostrado nas Figuras 7E e 8B (Equação 2) (Barr, 2010):

$$\vec{D} = I_o \vec{d} \quad \text{Equação 2}$$

onde \vec{D} é o momento de dipolo concentrado (unidade: A.m), \vec{d} é o vetor entre os monopólos (unidade: m), e I_o é a magnitude dos monopólos (unidade: A).

O momento de dipolo também pode ser definido como a integral da densidade de corrente (\vec{J}^i em A/m²) no volume da fibra (ΔV_f) (Equação 3):

$$\vec{D} = \int_{\Delta V_f} \vec{J}^i dv \quad \text{Equação 3}$$

A atividade elétrica cardíaca consiste na propagação do PA em várias fibras cardíacas, e o modelo mais simples para relacioná-la com o potencial medido na superfície do corpo é o modelo de um único dipolo (Malmivuo and Plonsey, 1995). A atividade elétrica no volume cardíaco é representada pela distribuição de monopolos fonte e carga em todas as fibras por onde o PA se propaga. O momento de dipolo resultante desta distribuição de monopolos é representado por um único dipolo localizado no centro do volume cardíaco, e é calculado pela integral da densidade de corrente neste volume (Equação 4) (Horáček, 2010):

$$\vec{H} = \int_{V_H} \vec{J}^i dv \quad \text{Equação 4}$$

onde \mathbf{H} é o momento de dipolo cardíaco resultante, denominado vetor do coração, V_H é o volume do coração, e \mathbf{J}^i é a densidade de corrente, que só não é nula nas regiões onde ocorre a propagação elétrica (Malmivuo and Plonsey, 1995; Plonsey, 1977).

A cada instante, o vetor do coração terá uma magnitude e uma orientação, pois estas dependem, respectivamente, do número e da direção dos dipolos individuais, ou seja, da massa de miocárdio que está sendo excitada e da direção e sentido da propagação em cada ponto da frente de onda de excitação (Horáček, 2010; Plonsey and Barr, 2007b). Assim como \mathbf{H} , o campo elétrico também é variante no tempo. Para simplificação, o sistema pode ser considerado quase-estático, ou seja, estático a cada instante.

Assumindo-se um volume condutor (torso) esférico, infinito e homogêneo (Malmivuo and Plonsey, 1995), e que a densidade das correntes envolvidas é pequena, pode-se considerar que o torso é um sistema físico linear conservativo. O potencial elétrico gerado por um dipolo medido no ponto A na superfície do volume, a uma distância r , é dado pela Equação 5 (Figura 9) (Barr, 2010; Cheng, 1989):

$$\phi_A(\vec{r}) = \frac{\vec{H} \cdot \hat{a}_R}{4\pi\sigma_e R^2} \quad \text{Equação 5}$$

onde Φ_A é o potencial elétrico medido em A (unidade: V), \mathbf{H} é o vetor do coração (unidade: A.m), \mathbf{a}_R é o vetor unitário radial que indica a direção do eixo que

liga o ponto O ao ponto de observação A, σ_e é condutividade do volume condutor, e R é o raio da esfera.

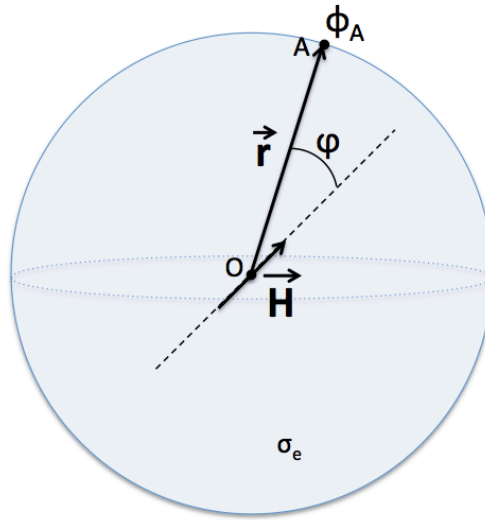


Figura 9 – Representação do volume condutor esférico (condutividade σ_e) que contém em seu centro (ponto O) o vetor do coração (H). O potencial medido no ponto A na superfície do volume (Φ_A) é função do vetor que descreve sua posição em relação ao centro da esfera (vetor r, de magnitude R) e do ângulo (φ) que ele forma com o eixo do vetor do coração.

A Equação 5 também pode ser escrita da seguinte forma:

$$\phi_A(\vec{r}) = \vec{H} \cdot \frac{\rho_e \hat{a}_R}{4\pi R^2} \quad \text{Equação 6}$$

$$\phi_A(\vec{r}) = \vec{H} \cdot \overrightarrow{OA} \quad \text{Equação 7}$$

onde ρ_e é a resistividade do volume condutor (unidade: Ωm), e **OA**, denominado vetor derivação unipolar, é o vetor cuja magnitude é a resistividade em toda a área de superfície do volume condutor (unidade: Ω/m) e cuja direção é radial ao ponto A.

Geometricamente, a Equação 7 indica que o potencial medido no ponto A é o produto escalar do vetor do coração e do vetor derivação unipolar, isto é, a projeção do vetor do coração no eixo formado entre o centro do volume condutor e o ponto de observação.

Neste contexto, a diferença de potencial entre dois pontos A e B (V_{AB}) é dada pela Equação 8:

$$V_{AB} = \phi_A - \phi_B = \vec{H} \cdot \vec{OA} - \vec{H} \cdot \vec{OB} = \vec{H} \cdot (\vec{OA} - \vec{OB}) = \vec{H} \cdot \vec{AB} \quad \text{Equação 8}$$

onde **OA** é o vetor derivação unipolar do ponto A, **OB** é o vetor derivação unipolar do ponto B, e **AB** é o vetor derivação bipolar cuja direção é aquela do eixo formado entre os pontos A e B.

No mesmo sentido, a Equação 8 indica que a diferença de potencial medida entre dois pontos na superfície do volume condutor equivale à projeção do vetor do coração no eixo formado pelos dois pontos.

Um modelo bastante conhecido para a medição na superfície do corpo dos potenciais gerados pelo vetor do coração é o triângulo de Einthoven (Einthoven et al., 1913). Neste modelo, considera-se que os pontos de medição (braços direito e esquerdo, e perna esquerda) são equidistantes entre si e do coração, como em um triângulo equilátero em cujo centro encontra-se o coração, no plano frontal. Os vetores derivação I, II e III são formados, respectivamente, entre os braços, entre perna esquerda e braço direito, e entre perna esquerda e braço esquerdo (Figura 10), e o registro de ECG obtido nas três derivações está exemplificado na Figura 11.

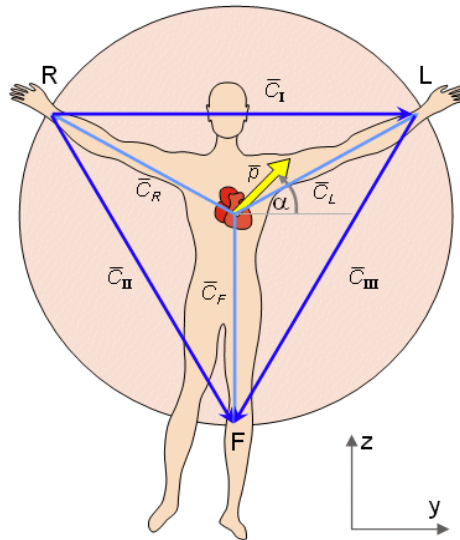


Figura 10 - Triângulo de Einthoven. CI (derivação I): eixo de medição entre braço esquerdo (L) e braço direito (R); CII (derivação II): eixo de medição entre perna esquerda (F) e braço direito; CIII (derivação III): eixo de medição entre perna esquerda e braço esquerdo. (Malmivuo and Plonsey, 1995). Licença para reprodução da imagem cedida pela Oxford University Press.



Figura 11 - Registros de eletrocardiograma em humano nas derivações I, II, III (Hampton, 2013). Licença para reprodução da imagem cedida pela Elsevier: 1982084.

O registro do ECG apresenta ondas geradas pela propagação da despolarização nos átrios (onda P) e nos ventrículos (complexo QRS), e pela repolarização ventricular (onda T). A magnitude destas ondas depende do vetor da derivação, portanto da direção e amplitude do vetor elétrico médio (resultante) do coração e da derivação. A duração dos segmentos e intervalos entre as ondas é utilizada para caracterização do ECG em clínica médica. Por exemplo, o intervalo QT (entre o início da onda Q e o término da onda T) corresponde ao tempo total de atividade elétrica ventricular, i.e., do início da despolarização até o término da repolarização ventricular. O segmento ST (que vai do término da onda S ao início da onda T) é o tempo entre o término da propagação da despolarização e o início da onda de repolarização ventricular. Por fim, o segmento TP (do término da onda T ao início da onda P) representa o período de repouso elétrico cardíaco (Guyton and Hall, 2006; Hampton, 2013; Silverthorn, 2010)

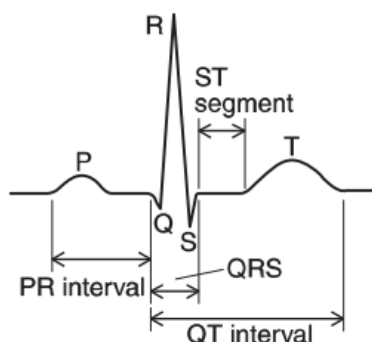


Figura 12 - Componentes do registro de eletrocardiograma. Ondas P, Q, R, S e T. *PR interval*: intervalo PR; *ST segment*: segmento ST; *QT interval*: intervalo QT. Modificado de HAMPTON, 2013. Licença para reprodução da imagem cedida pela Elsevier: 1982084.

O eletrocardiógrafo é um instrumento de grande relevância para o presente estudo, que permite o registro não invasivo da atividade elétrica cardíaca, fornecendo informações sobre sua geração e propagação. Por exemplo, é possível calcular a FC *in vivo* de modo não invasivo a partir do inverso do intervalo entre os picos de onda R.

2. Objetivos

Objetivo geral:

Registrar o eletrocardiograma em lagartixas (*Hemidactylus mabouia*) e obter a FC média *in vivo* do animal em diferentes condições experimentais.

Objetivos específicos:

- Projetar e construir um amplificador de biopotenciais para registro de ECG em animais de pequeno porte;
- Desenvolver a metodologia experimental para registrar o ECG de lagartixas em ambiente laboratorial;
- Registrar o ECG da lagartixa e descrever o sinal elétrico registrado;
- Realizar um estudo preliminar para a medição da FC a partir da detecção dos movimentos do coração com um sensor de luz;
- Medir a FC em diferentes condições experimentais.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizadas lagartixas adultas de ambos os sexos, com massa corporal de $5,69 \pm 1,12$ g (N = 13) e comprimento narina-cloaca de $53,83 \pm 3,22$ mm (N = 7), provenientes da região de Barão Geraldo, Campinas, SP. Os animais foram capturados com a utilização de uma armadilha especificamente projetada para a lagartixa e desenvolvida pela Área de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro de Engenharia Biomédica (CEB) da UNICAMP.

Os animais foram mantidos em terrário (no máximo, 2 animais simultaneamente) no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do CEB-UNICAMP, onde os experimentos foram realizados. A alimentação foi baseada em larvas vivas de insetos (*Tenebrio molitor* e *Ulomoides dermestoides*) *ad libitum* por um período de 1 a 3 semanas. A massa corporal foi acompanhada diariamente, e a lagartixa era liberada no caso de ter perdido massa em 3 dias consecutivos.

Os procedimentos de captura e de utilização dos animais foram aprovados, respectivamente, pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA; licença nº 14566) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (CEUA/IB/UNICAMP; protocolos 2331-1, 3283-1 e 3657-1).

3.2 Amplificador de Biopotenciais

Segundo Webster (2009), um eletrocardiógrafo deve conter, como requerimento básico, um pré-amplificador que receberá o sinal com altíssima impedância de entrada e uma alta rejeição de modo comum (*common-mode rejection ratio* - CMRR). Tipicamente, é utilizado o amplificador de instrumentação composto de três amplificadores operacionais (Figura 13). A seguir, o sinal deve ser amplificado a um nível de tensão que facilite a sua visualização. A entrada do amplificador deve ter acoplamento CA (corrente alternada) ou controle de *offset* para evitar saturação do sinal e amplificação de *offsets* intrínsecos do circuito. Por último, tem-se a gravação do registro, que pode ser por impressão em papel ou registro eletrônico. No último caso, é necessário converter o sinal analógico do amplificador para sinal digital para ser trabalhado em um computador.

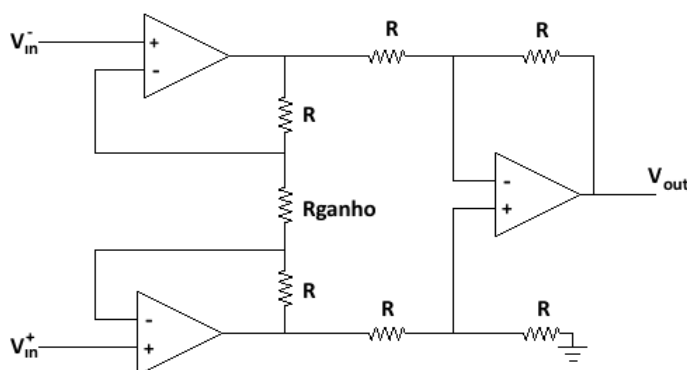


Figura 13 - Amplificador de instrumentação. A parte à direita é um amplificador diferencial que tem baixa impedância de entrada. A parte à esquerda mostra dois amplificadores adicionais que podem providenciar alta impedância de entrada e alto ganho. Os três amplificadores formam o amplificador de instrumentação. Modificado de WEBSTER, 2009.

Filtros são necessários para minimizar ruídos provenientes de sinais não-biológicos e biológicos de outras fontes. O filtro passa-baixas atenua os sinais de alta frequência provenientes da atividade muscular, o filtro *notch* 60 Hz atenua os sinais provenientes da rede elétrica, e o filtro passa-altas estabiliza a linha de base. Usualmente, os eletrocardiógrafos para humanos apresentam: a) uma faixa de frequência de 0,5–40 Hz para monitoração, e de 0,05–150 Hz para diagnóstico; b) um ganho tipicamente de 1000; e c) CMRR em uma faixa de 80–120 dB (Gregg et al., 2008; Webster, 2006, 2009).

Em alguns trabalhos com répteis, o ECG foi registrado com eletrocardiógrafos comerciais (Liu and Li, 2005; Porcell and González, 1986; Yackzan et al., 1972; Zaar et al., 2004), enquanto que em outros estudos, pouco é dito sobre o amplificador utilizado (Burns, 1971; Dawson, 1960; Dawson and Templeton, 1963). No estudo do Zaar *et al.* (2004) foi utilizado um pré-amplificador projetado com ganho de 200, faixa de frequência de 0,14 a 40 Hz, e frequência de amostragem de 200 Hz.

Com base na literatura, foram projetados dois instrumentos de medição, o primeiro apresentou frequências de corte e ganho variáveis, a fim de se identificar a faixa de frequência do registro do ECG e a amplitude do sinal, e outro, com os valores fixados. Ambos os instrumentos foram compostos de amplificador de instrumentação, e filtros passa-altas, passa-baixas e *notch*.

O primeiro instrumento, cujo diagrama em blocos está apresentado na Figura 14, foi projetado com um amplificador clássico de biopotenciais com três canais (positivo, negativo e referência) para medição de uma derivação. Foi utilizado

o amplificador de instrumentação PGA204 (*Burr-Brown, 16-PIN Plastic DIP*), cujo ganho é variável digitalmente de 1 a 1000 em múltiplos de 10 (Tabela 1), alta impedância de entrada ($10^{10} \Omega$) e alto CMRR (tipicamente: 114 dB, G=10 e 123 dB, G=100). Os filtros passa-altas e *notch* apresentaram a configuração de filtro *Butterworth* de 4ª ordem, com topologia *Sallen Key*, e frequências de corte 0,5 e 60 Hz respectivamente. Como filtro passa-baixas, foi utilizado o circuito integrado (CI) LMF60 (*National Semiconductor, 14-PIN Plastic DIP*), que é um filtro chaveado *Butterworth* de 6ª ordem, com frequência de corte variável. Para se avaliar os componentes de alta frequência do sinal, a frequência de corte foi variada de 70 a 100 Hz, e, posteriormente, mantida em ~75 Hz.

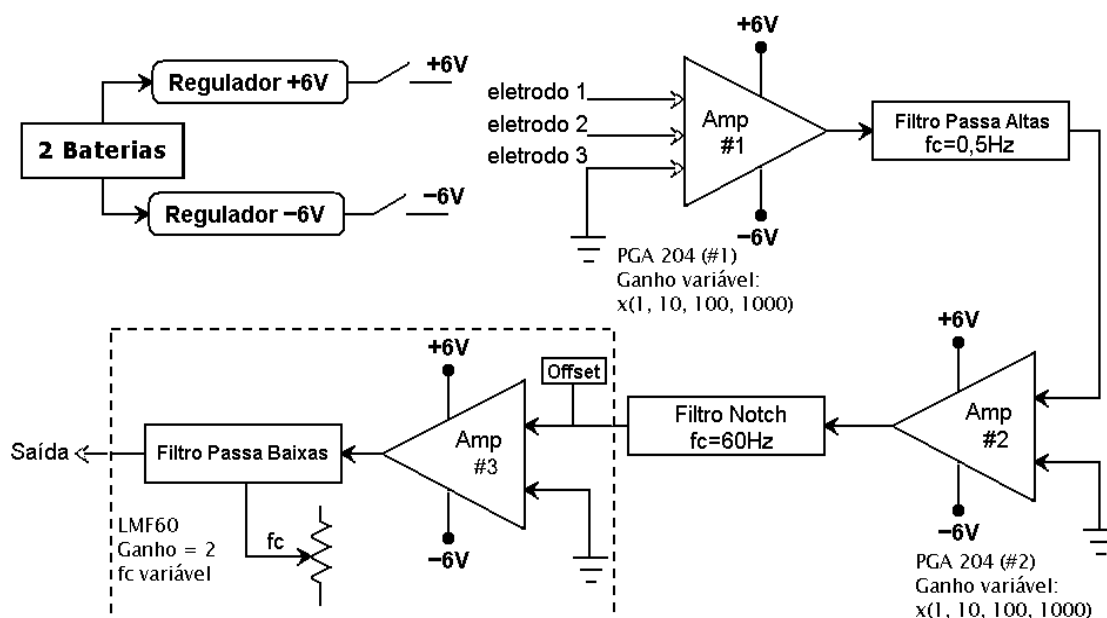


Figura 14 - Diagrama em blocos do primeiro amplificador de biopotenciais desenvolvido (ver o texto, para maiores detalhes).

O ganho do amplificador PGA204 é configurado com dois botões em *pull-up*. Cada um define nível lógico alto (tensão positiva) ou baixo (terra) no respectivo pino. A Tabela 1 ilustra as combinações dos pinos 15 e 16 do amplificador PGA204 que configuram o ganho do amplificador.

Tabela 1: Configuração do ganho do amplificador PGA204.

PGA 204		
Ganho	Pino 16	Pino 15
1	0	0
10	0	1
100	1	0
1000	1	1

As Figura 15 e 16 ilustram, respectivamente, a resposta em frequência do amplificador de biopotenciais e o instrumento finalizado.

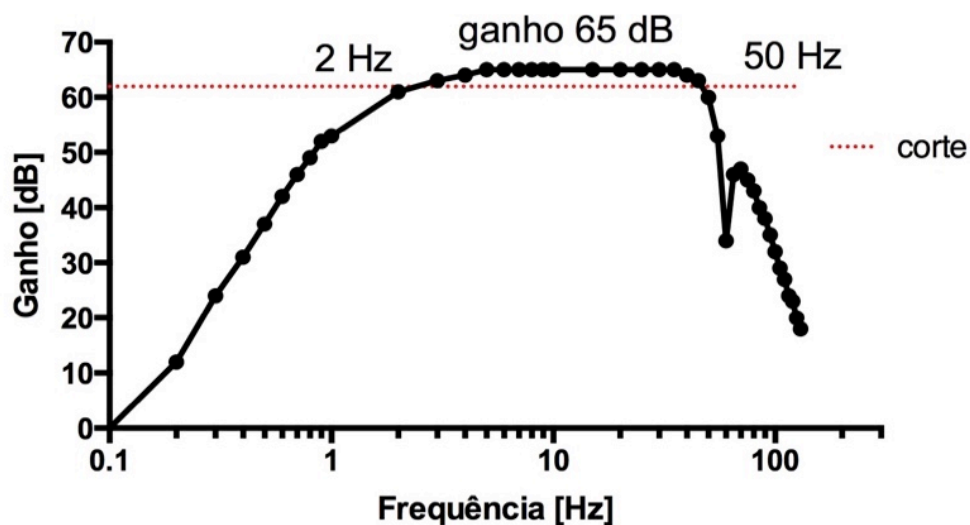


Figura 15 - Resposta em frequência do primeiro instrumento desenvolvido, com faixa de frequência de 2 a 50 Hz e 65 dB de ganho (1778 vezes). A linha tracejada corresponde ao corte (-3 dB do ganho), e estão indicadas as frequências de corte.



Figura 16 – Amplificador de biopotenciais, versão 1. Os botões nas partes superior e inferior do painel permitem ajuste do ganho do primeiro e segundo amplificadores, respectivamente.

A montagem final do primeiro amplificador de biopotenciais foi composta de quatro estágios, o primeiro de pré-amplificação utilizando o PGA204, o segundo com os filtros passa-altas e *notch*, o terceiro com PGA204, e o último estágio formado pelo LMF60, onde o sinal passou por um circuito somador com controle de *offset* ativo com ganho de duas vezes, e foi filtrado na frequência de corte do filtro passa-baixas.

A partir dos resultados obtidos dos registros de ECG da lagartixa com o primeiro instrumento, foi desenvolvida a segunda versão (final) com algumas modificações, entre elas a faixa de frequência operante. Vale ressaltar que tal modificação não interfere nos valores de FC medidos com ambos os instrumentos: ela apenas altera a banda de passagem das componentes em frequência do sinal.

Uma das alterações feitas foi a redução da frequência de corte do filtro passa-altas de 0,5 para 0,05 Hz. Esta modificação permite a passagem de sinais de menor frequência e minimiza distorções do nível DC presentes no ECG, principalmente o segmento ST (Gregg et al., 2008). Para se obter esta frequência de corte, faz-se necessário o uso de capacitores com alta capacitância. Para evitar o uso de capacitores eletrolíticos, foi utilizado o CI UAF42 (*Texas Instrument, 14-PIN Plastic DIP*), que é um filtro universal ativo que pode ser configurado para o tipo de filtro e frequência de corte desejados com o uso de alguns resistores e capacitores.

Outra modificação foi a substituição do filtro passa baixas (CI LMF60) por um circuito *Butterworth* de 4ª ordem com frequência de corte fixa (80 Hz). A

substituição contribuiu para a diminuição de ruído, pois o CI LMF60 é um filtro com capacitor chaveado, que apresenta relação sinal/ruído inferior aos filtros RC (Gobet and Knob, 1983; Gregg et al., 2008). Como este CI foi retirado, o circuito de *offset* também foi alterado para um circuito somador ativo com ganho dois em um dos amplificadores do CI TL072.

Por fim, o primeiro amplificador PGA204 teve seu ganho fixado em 10, e, para o segundo, foram introduzidas as opções de 100 e 1000. Isto facilita o manuseio do instrumento pelo usuário, pois o número de botões no painel para ajuste de ganho foi reduzido de 4 para 1, o que tornou o ajuste do ganho mais simples.

O CI PGA204 apresenta uma configuração denominada circuito de retorno à malha (CRM). Este circuito atenua as interferências eletromagnéticas ao conduzir o inverso da tensão de modo comum das tensões de entrada dos eletrodos para a malha dos cabos dos eletrodos. Similarmente, em registros de ECG em humanos, utiliza-se o circuito *right leg drive* para atenuar ruído, conduzindo o inverso do modo comum a um eletrodo conectado à perna direita (Acharya, 2011). Nesta última versão do amplificador, é possível escolher conectar o eletrodo de referência ao terra do circuito ou ao CRM.

As Figura 17,18,19 ilustram, respectivamente, o diagrama em blocos do circuito da segunda versão do amplificador, sua resposta em frequência e a placa do circuito impresso.

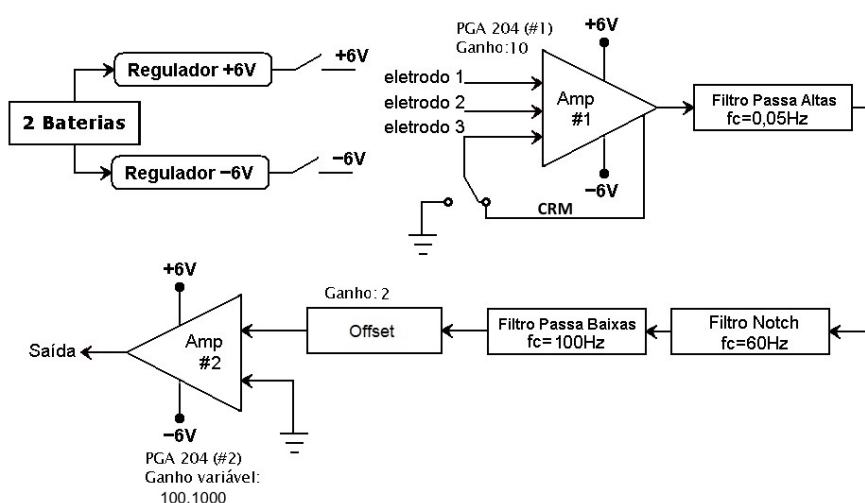


Figura 17 - Diagrama em blocos da versão final desenvolvida do amplificador de biopotenciais. O eletrodo de referência (eletrodo 3) pode estar configurado para ser ligado ao terra do circuito, ou ao *feedback* do modo comum do pré-amplificador, denominado circuito de retorno à malha (CRM) (ver o texto para maiores detalhes).

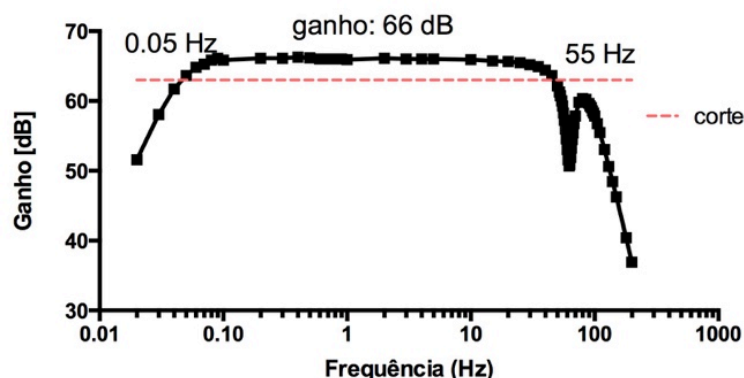


Figura 18 - Resposta em frequência da versão final desenvolvida do amplificador de biopotenciais. A faixa de frequência foi ampliada para 0,05 a 55 Hz, com 66 dB de ganho (1995 vezes). A linha tracejada corresponde a -3 dB do ganho, e estão indicadas as frequências de corte.

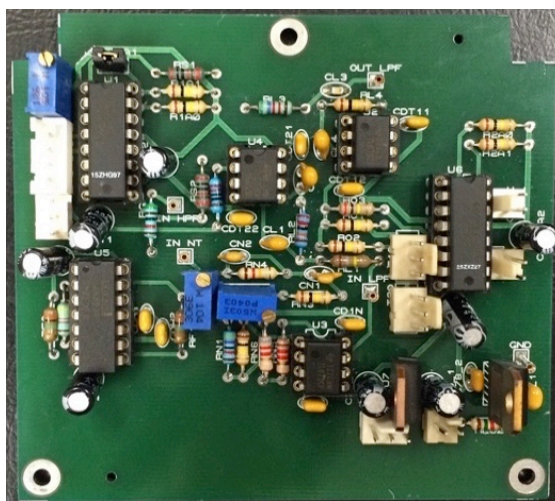


Figura 19 - Fotografia da placa do circuito impresso da versão final do amplificador de biopotenciais.

A saída do amplificador de biopotenciais foi conectada a uma interface analógica-digital DAC NI-USB-6008 (*National Instruments*) que possibilitou a monitoração e armazenamento do sinal, fazendo-se uso de dois programas de aquisição de dados escritos para a plataforma *Labview®*, desenvolvidos no CEB/UNICAMP. Nos primeiros registros de ECG, cujo objetivo era o cálculo da FC, foi utilizado o programa com frequência de amostragem de 100 Hz (Marques Jr. e J.W.M. Bassani, não publicado). Posteriormente, foi utilizado o programa com frequência de amostragem de 250 Hz (Almeida et al., 2011), pois os registros foram utilizados para caracterização das ondas e indicadores temporais do ECG.

Para a estimativa da FC de forma simplificada (i.e., sem necessidade de registro elétrico), baseou-se no fato de que a luz emitida por um iluminador de laser vermelho é capaz de atravessar o tórax da lagartixa, possibilitando a detecção do movimento do coração durante sua contração e relaxamento, a partir de variação da

intensidade da luz que chegava ao outro lado do tórax (método do movimento contrátil cardíaco, MC). Para este fim, foi construído um circuito com um resistor dependente de luz (LDR), montado em série com um resistor variável, e alimentado por quatro pilhas AA em série (Figura 20). A movimentação do coração mudava a luminosidade captada pelo LDR (e, conseqüentemente, a resistência do dispositivo), que foi posicionado na face torácica oposta àquela iluminada. A tensão neste resistor era registrada, juntamente com o ECG, pelo programa em *Labview®*.

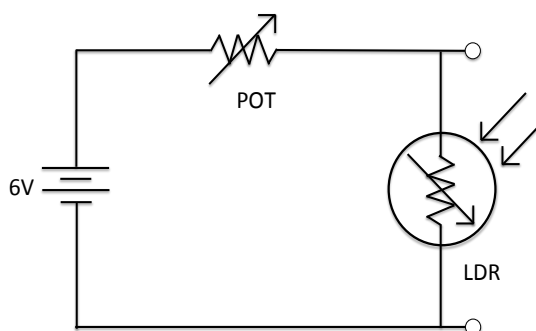


Figura 20 - Circuito com resistor sensível à luz (LDR) alimentado com 6 V (associação de pilhas). A medição realizada é a tensão sobre o LDR, e a calibração da amplitude do sinal é feita com um potenciômetro (POT).

3.3 Protocolo Experimental

Todas as medições foram realizadas em temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). As primeiras medições foram realizadas com o animal imobilizado em decúbito dorsal na mão do pesquisador, e esta condição foi denominada imobilização manual (IM, Figura 21). Nela, foram testados alguns eletrodos, entre eles eletrodo circular comercial de Ag-AgCl, eletrodo pontual de Ag-AgCl e eletrodos moldados com fio de aço cirúrgico em diversos formatos. Todos apresentaram bons resultados, e foi escolhido o eletrodo circular convencional com 10 mm de diâmetro (3M, espuma 2223BRQ, sem o gel sólido, somente o pino e contra-pino de Ag-AgCl) para posteriores medições. Também nesta condição, foi possível estabelecer qual a melhor derivação do ECG, que foi equivalente (aproximadamente) à derivação II do triângulo de Einthoven, mas com eletrodos posicionados na cabeça, abdômen e cauda, correspondendo, respectivamente, aos terminais negativo, positivo e de referência do amplificador.



Figura 21 - Condição de imobilização manual (durante a medição a lagartixa era posicionada em decúbito dorsal).

Durante as medições, foi observado que, algumas vezes, os animais permaneciam imóveis e rígidos quando posicionados em decúbito dorsal. Este comportamento foi identificado como a condição de imobilidade tônica (IT, Figura 22), que é interpretada como um comportamento de defesa contra predadores, i.e., morte simulada (Hennig and Dunlap, 1978; Prestrude and Crawford, 1970). Este comportamento foi induzido experimentalmente posicionando o animal em decúbito dorsal sobre uma plataforma horizontal, com aplicação manual de uma leve pressão à superfície ventral de seu corpo. Nesta condição, também foi possível fazer medições da FC com a luz, posicionando o circuito com LDR na parte dorsal do tórax do animal, e o laser sobre a região ventral do tórax, onde fosse possível detectar o movimento do coração.

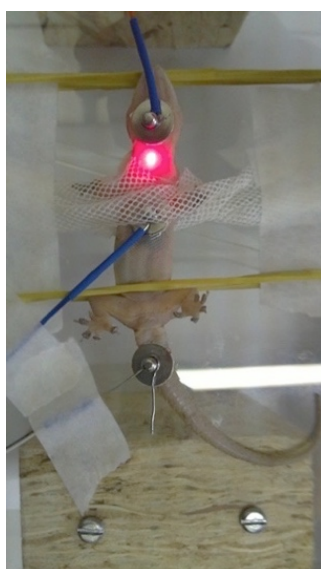


Figura 22 - Lagartixa durante o registro simultâneo do eletrocardiograma e de movimentos cardíacos detectados com luz.

A terceira condição experimental, denominada sem restrição física (SR, Figura 23), foi desenvolvida a partir de observações de que as lagartixas procuram refúgio dentro de tubos de polivinil carbono (PVC) no terrário. A partir disto, um tubo de PVC foi instrumentado com uma malha de eletrodos no seu interior (10 eletrodos acessados pelo lado de fora), próximo a uma das extremidades. Na outra extremidade, foi colocada uma tampa de acrílico transparente para possibilitar a visualização da posição do animal, o que permitiu a escolha dos três eletrodos mais próximos à cabeça, abdômen e cauda.

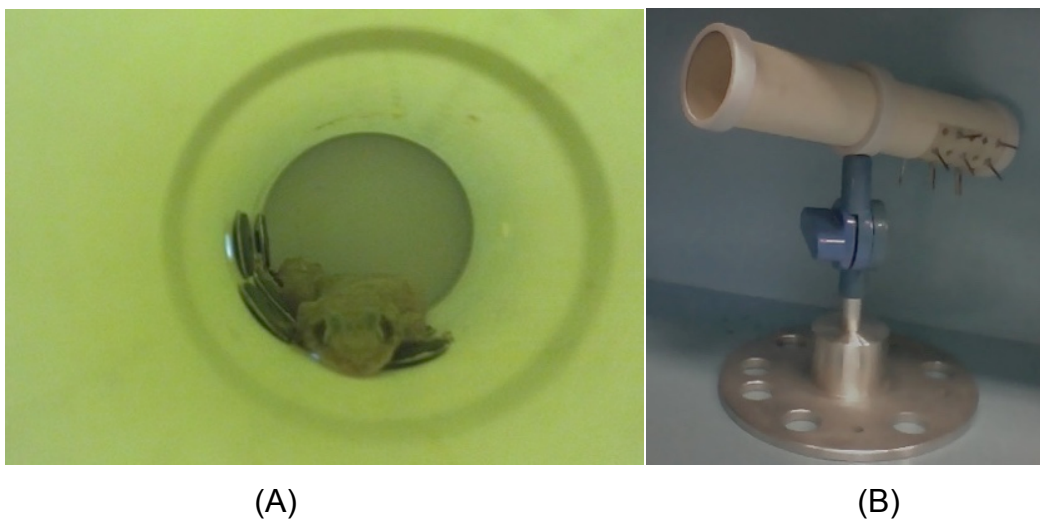


Figura 23 - Condição de sem restrição física. (A) Lagartixa no interior do tubo de medição; (B) Tubo instrumentado com eletrodos.

3.4 Análise dos Dados

Promediação do Sinal e Estimativa da FC

Para o cálculo da FC, foi projetado um programa interativo em *Matlab*®. Neste algoritmo, o usuário carrega um registro de ECG, que foi salvo pelo programa em *Labview*®, e que está disposto em uma tabela com duas colunas (tempo e tensão). Primeiramente, o programa cria uma figura de todo o registro, do qual o usuário seleciona o intervalo a ser analisado, permitindo a eliminação de regiões com ruído (Figura 24A). Esta e todas as demais interações com o usuário são realizadas com o clique do *mouse* no ponto escolhido da figura. Nesta etapa, o usuário clica em dois pontos na figura, que correspondem ao ponto inicial e final do intervalo desejado do registro. A seguir, o programa elimina variações da linha de base e aguarda o usuário selecionar o valor mínimo da amplitude do pico R. Automaticamente, o programa identifica e marca na figura todos os possíveis picos R. Após esta etapa, o programa permite ajustes manuais para o acréscimo ou eliminação de picos R (Figura 24B,C). Com todos os picos R selecionados, o programa cria um vetor com todos os intervalos RR (RRI) instantâneos, ou seja, a duração entre dois picos R consecutivos, e outro, de 40 posições (N=40), com o inverso dos primeiros RRIs, ou seja, os valores das FC instantâneas. Caso o registro não apresente 41 picos, ou seja, 40 intervalos, o programa montará um vetor de frequência com o número máximo de intervalos. A partir deste vetor, são calculadas a frequência média do registro e o erro padrão da média (EPM).

Este programa também faz a promediação de todos os intervalos RR do registro em análise, e permite ao usuário selecionar manualmente os seguintes pontos: picos R, S, T e P; início das ondas R, T e P; e término das ondas S, T e P (Figura 24D,E). Só foram marcados os pontos visivelmente detectáveis; se houvesse dúvidas quanto ao início/término da onda, o ponto não receberia marcação. Com os valores de duração e amplitude de cada onda, o programa calcula índices característicos do ECG, como segmentos e intervalos, e amplitudes das ondas.

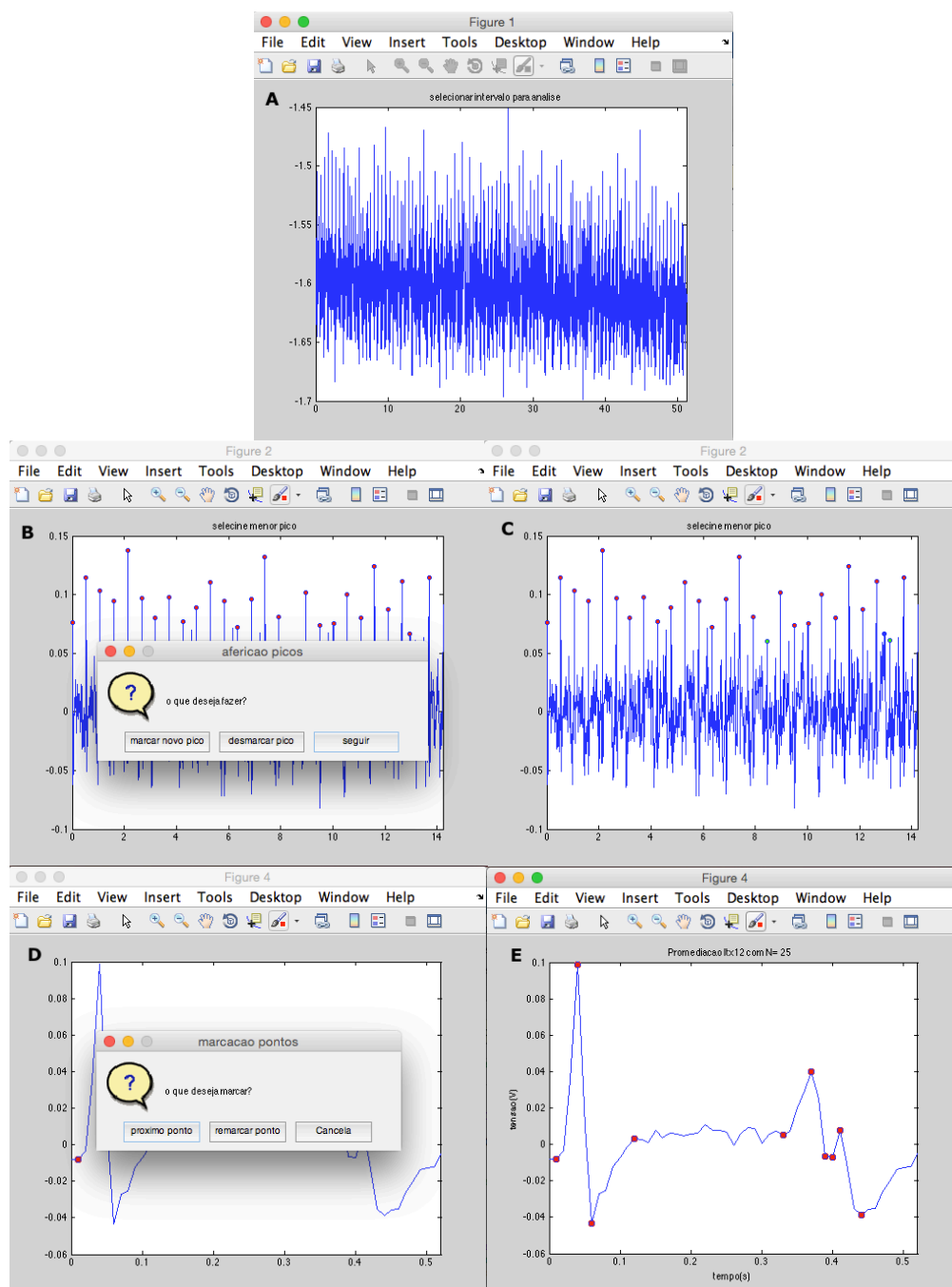


Figura 24 - Telas apresentadas durante o uso do programa em *Matlab*® para análise do registro de eletrocardiograma. A) Registro completo; B) os picos R são automaticamente selecionados (marcados com pontos vermelhos), com a caixa de opções para o usuário marcar um novo ponto, desmarcar um ponto, ou seguir; C) figura com os picos selecionados para promediação; o ponto azul claro indica um pico acrescentado, e o ponto azul escuro indica um pico excluído; D) registro promediado com as opções para marcar os pontos que delimitam ondas e segmentos; E) registro promediado com os pontos marcados pelo usuário.

Foram obtidos de cada lagartixa aproximadamente 8 registros, dos quais a FC foi calculada pelo algoritmo no *Matlab*®. Portanto, foi necessário um critério de seleção da FC média representativa do animal entre os valores de cada registro. Na

maioria dos animais, observou-se que a FC nos primeiros registros era maior do que a nos últimos registros. Ao se analisar o valor de FC em registros sucessivos, foi observado que a FC caiu de modo exponencial ao longo do tempo, e atingiu valores estáveis após 15-20 min de registro, conforme apresentado na Figura 25. Os maiores valores iniciais de FC poderiam ter sido devidos a uma reação de alarme do animal à situação nova (manipulação pelo experimentador ou acesso ao compartimento instrumentado). Como se desejava a FC mais próxima à frequência de repouso, para cada animal, foi considerado como representativo o menor valor médio de FC, desde que o N não fosse menor que 40, que, na maioria dos animais, correspondeu ao valor de FC do último registro.

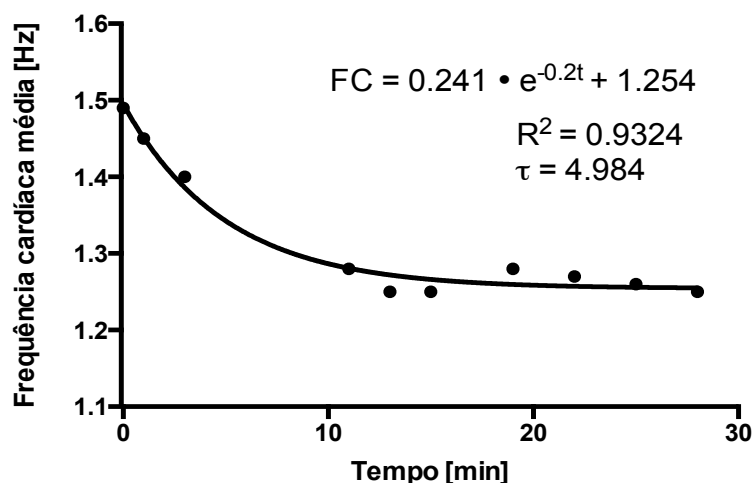


Figura 25 – Frequência cardíaca média (FC) em 10 registros sucessivos de eletrocardiograma medidos em uma lagartixa. A abscissa corresponde ao tempo desde o início do registro.

O cálculo da FC a partir do registro de MC também foi feito através do programa em Matlab em registros nos quais era possível se distinguir claramente os picos do sinal de MC e as ondas R do ECG. O registro simultâneo de MC e ECG foi realizado em 3 animais.

Análise do RRI no Domínio do Tempo

A variabilidade temporal da sequência de RRI obtida de todos os registros ($N > 60$) foi estimada pelo coeficiente de variação ($CV_{RRI} = DP_{RRI} \times 100 / \text{média}$, onde DP é o desvio padrão; (De Vera et al., 2000)).

Relação dos Segmentos e Intervalos do ECG

A duração dos intervalos e segmentos obtidos dos registros promediados de ECG dos animais na condição IT foram relacionados com o respectivo ciclo

cardíaco (intervalo RR). Só foram considerados registros cujas ondas R, S, T e P eram claramente identificáveis. Foi selecionada a condição IT, pois nela era possível maior certeza da manutenção da disposição dos eletrodos nos animais (eixo narinacloaca), diferentemente da condição SR, na qual seria mais provável haver uma pequena variação no eixo elétrico de registro, o que poderia afetar o sinal de ECG.

3.5 Análise Estatística

Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A distribuição normal dos valores de duração de intervalos e segmentos do ECG foi confirmada pelo teste de D'Agostino e Pearson.

Para comparação estatística dos valores de FC e de CV_{RRI} nas três condições experimentais, utilizou-se análise de variância monofatorial, seguida de teste *post hoc* de Bonferroni em caso de ocorrência de diferença significativa ($p < 0,05$). Para a comparação dos valores de FC obtidos a partir dos registros simultâneos de ECG e MC, utilizou-se teste t de *Student* para amostras pareadas.

A relação entre a duração dos intervalos (QT e PR) e segmento (TP) e a duração média ciclo cardíaco correspondente foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson, após ajuste de uma função linear.

Utilizou-se para os ajustes de funções e testes estatísticos o programa *Prism®*, versão 5 (Graphpad Software, Inc., EUA).

4. Resultados

4.1 Estimativa da FC a Partir do Registro Eletrocardiográfico

Registros de ECG obtidos de diferentes animais nas três condições experimentais estão ilustrados na Figura 26.

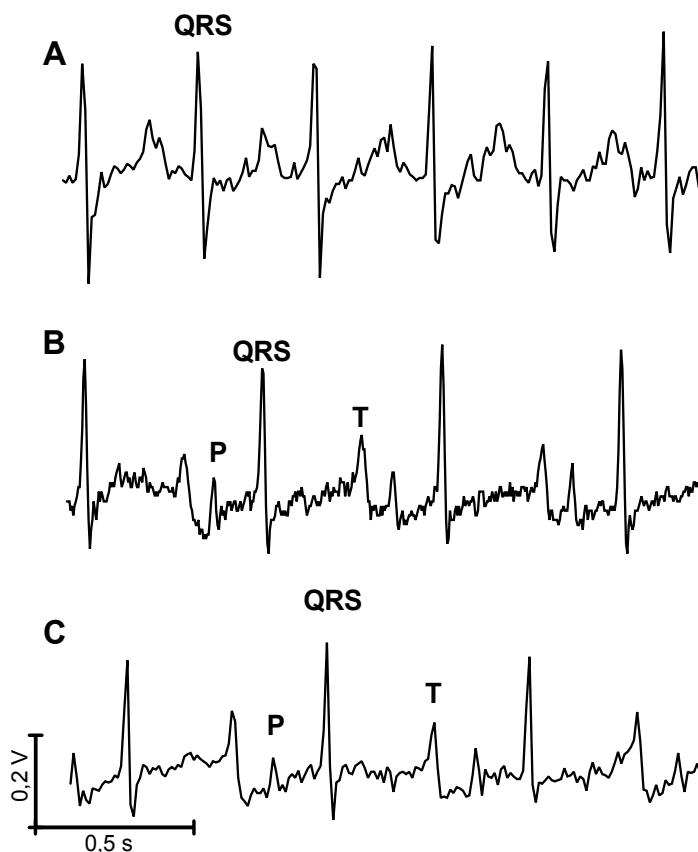


Figura 26 - Registros do eletrocardiograma de lagartixas em três condições experimentais. A) condição em imobilização manual; B) condição em imobilização tônica; C) condição sem restrição física. Estão destacadas a onda P, o complexo QRS e a onda T, que correspondem, respectivamente, à despolarização atrial, à despolarização ventricular e à repolarização ventricular.

Nota-se que é possível identificar claramente as ondas R e S e, em alguns registros, também as ondas T e P, encontradas no ECG de mamíferos. Na Figura 26A, observa-se dois picos muito próximos, que podem ser as ondas P e T sobrepostas, o que impossibilita a sua identificação. A sobreposição ocorreu nos registros com FC média superior a 2,5 Hz. Porém, em nenhum registro foi possível identificar a onda Q. Embora, na maioria dos casos, a deflexão Q não esteja presente, para a manutenção da nomenclatura das ondas e dos índices utilizados na análise de ECG, será utilizada neste trabalho a expressão “complexo QRS”. Para cálculo da duração deste complexo e do intervalo QT, assumiu-se como ponto inicial o início da deflexão R.

A Figura 27 ilustra os valores de FC de todos os registros obtidos nos diferentes animais, nas diferentes condições experimentais. A Tabela 2 apresenta a FC média representativa de repouso determinada em cada lagartixa usando o critério descrito em Materiais e Métodos, em que, para cada lagartixa, foi selecionado o registro no qual a FC foi menor.

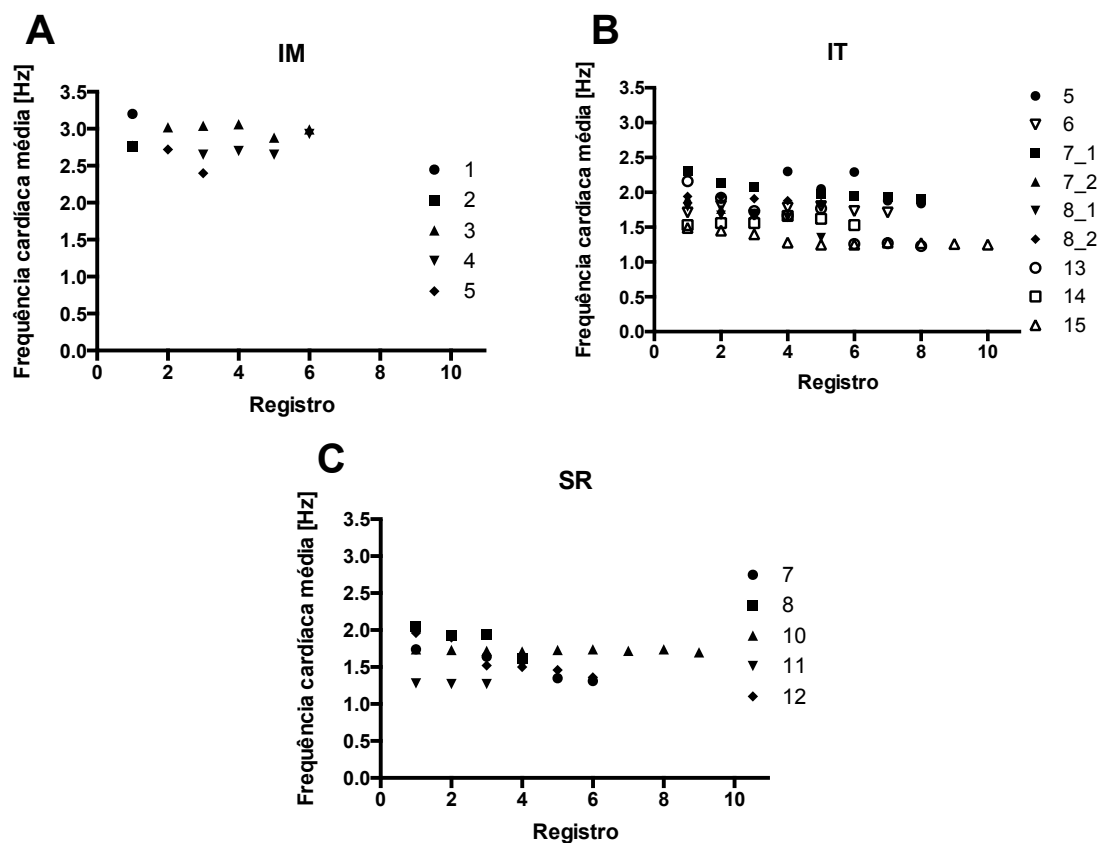


Figura 27 - Valores médios de frequência cardíaca obtidos de registros eletrocardiográficos sucessivos em lagartixas nas seguintes condições experimentais: A) imobilização manual (IM); B) imobilização tônica (IT); C) ausência de restrição física (SR). Os números (1-15) indicam diferentes animais. Mais de um conjunto de pontos para o mesmo animal (ex., 7_1, 7_2) refere-se a experimentos realizados em diferentes dias.

Tabela 2: Frequência cardíaca média em lagartixas, estimada nas três condições: imobilização manual (IM), imobilização tônica (IT) e ausência de restrição física (SR). n: número de animais; EPM: erro padrão da média.

Animal	IM	IT	SR
1	3,30 ± 0,100		
2	2,76 ± 0,005		
3	3,02 ± 0,007		
4	2,70 ± 0,003		
5	2,72 ± 0,007	1,88 ± 0,003	
6		1,71 ± 0,004	
7		1,70 ± 0,004	1,31 ± 0,006
8		1,35 ± 0,004	1,94 ± 0,004
9			
10			1,70 ± 0,003
11			1,27 ± 0,002
12			1,36 ± 0,006
13		1,23 ± 0,004	
14		1,53 ± 0,008	
15		1,25 ± 0,004	
n	5	7	5
Média [Hz]	2,90	1,52	1,52
EPM	0,12	0,10	0,13

A Figura 28 mostra que a FC foi significativamente afetada pela condição experimental ($p < 0,05$; análise de variância), atingindo valores maiores ($p < 0,05$; teste de Bonferroni) na condição IM ($2,90 \pm 0,12$ Hz, $n = 5$) do que nas condições IT ($1,52 \pm 0,10$ Hz, $n = 7$) e SR ($1,52 \pm 0,13$ Hz, $n = 5$). Para esta comparação, utilizou-se os valores apresentados na Tabela 2.

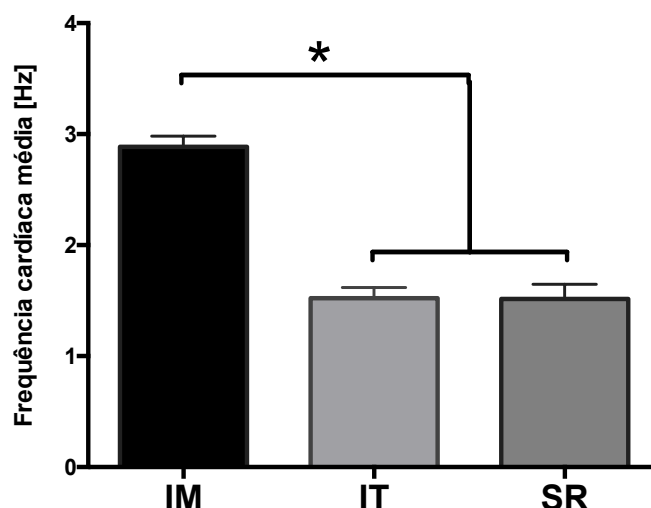


Figura 28 - Frequência cardíaca média em lagartixas (*H. mabouia*) sob três condições experimentais. IM: imobilização manual; IT: imobilização tônica; e SR: ausência de restrição física. Dados apresentados como média \pm erro padrão. * $p < 0,05$, teste de Bonferroni. Figura modificada (Germer et al., 2015); licença para reprodução de imagem cedida pela Springer Publishing Company nº: 3626680747431.

É interessante observar que não foi encontrada diferença significativa entre os valores de FC nas condições IT e SR, apesar de ser provável que a primeira condição possa induzir estresse no animal por estar associada à reação da presa ao predador (Gallup et al., 1980). Avaliando-se a série RRI, e comparando-se os coeficientes de variação das séries (com $N \geq 60$), observou-se que este variou significativamente com a condição experimental ($p < 0,05$; análise de variância), mostrando-se menor em IT do que em SR ($p < 0,05$; teste de Bonferroni), como indicado na Figura 29.

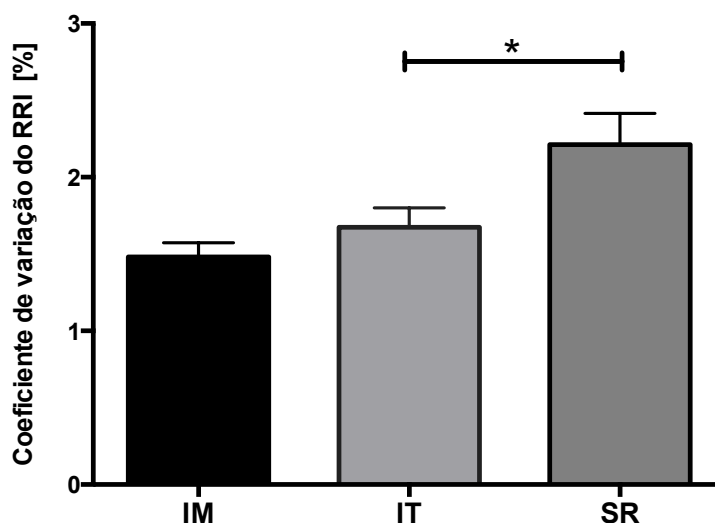


Figura 29 – Coeficiente de variação da série dos intervalos RR instantâneos nas três condições experimentais: imobilização manual (IM), imobilização tônica (IT) e ausência de restrição física (SR). Dados apresentados como média \pm erro padrão. * $p < 0,05$, teste de Bonferroni.

4.2 Estimativa da FC a Partir do Registro do Movimento Cardíaco

A Figura 30 ilustra o registro de ECG obtido durante IT, com o registro simultâneo da tensão de saída no LDR (detecção de movimentos cardíacos com luz). O intervalo médio entre picos obtido pelo MC foi $0,52 \pm 0,01$ s ($n = 10$), e não foi significativamente diferente do intervalo médio medido no ECG registrado simultaneamente com o MC, que também foi de $0,52 \pm 0,01$ s ($p = 0,6558$; $n=10$, teste t para amostras pareadas). Ressalta-se que, ao contrário do que foi feito para a estimativa da FC média de repouso, não foram selecionados, necessariamente, os últimos registros de ECG, nos quais os valores de FC foram mais baixos, mas registros nos quais os picos de MC podiam ser claramente identificados (detalhes em Materiais e Métodos).

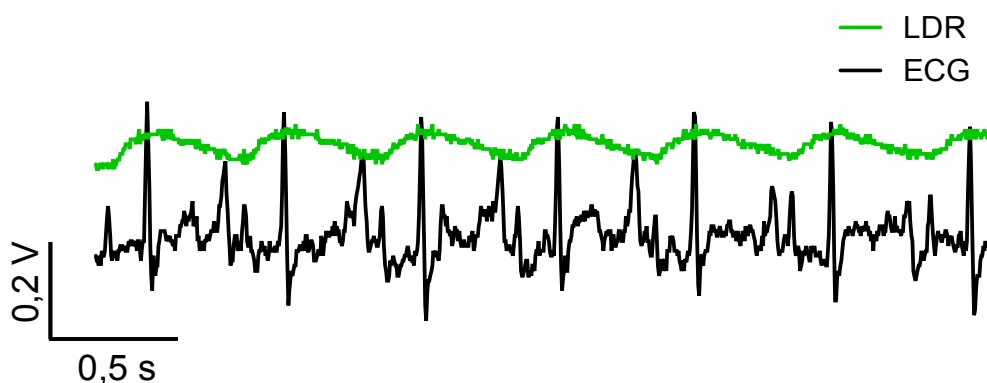


Figura 30 - Registro do eletrocardiograma (ECG; traçado preto) em lagartixa durante imobilização tônica, com medição simultânea do movimento contrátil cardíaco por detecção de variação de luminosidade transtorácica (traçado verde). LDR: tensão no sensor de luz.

4.3 Parâmetros Temporais Derivados do ECG

Para melhor visualização das ondas características do ECG, foi realizada promediação do sinal de ciclos sucessivos. A Figura 31 ilustra registros promediados de animais com diferentes valores médios de FC (2,76; 1,70 e 1,46 Hz). Nos registros, estão indicados os intervalos QRS e QT, e os segmentos TP e ST, quando identificáveis. Embora não aparente nos traçados da figura, observou-se grande variabilidade da duração do segmento TP. Foi observada, em alguns casos, sobreposição das ondas T e P (Figura 31A), o que impossibilitou a medição do segmento TP e do intervalo QT. Houve também diferenças no formato do complexo QRS (compare o painel A com os painéis B e C). Provavelmente, isto se deveu a

variação na direção do eixo elétrico formado pelos eletrodos. Por exemplo, no caso da Figura 31A, a medição foi feita na condição IM, enquanto que a condição foi IT e SR nos registros mostrados nas Figura 31B,C, respectivamente.

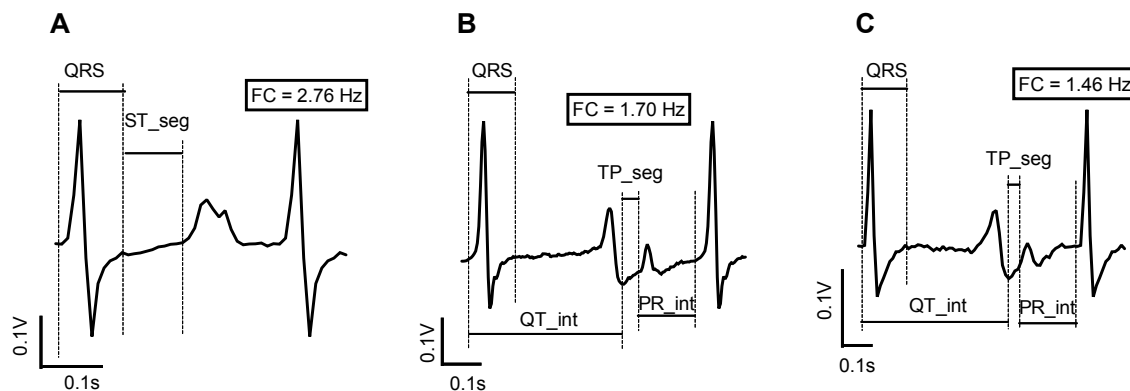


Figura 31 – Registros promediados de eletrocardiograma nas três condições experimentais: A) imobilização manual (N=51); B) imobilização tônica (N=52); C) ausência de restrição física (N=65). QRS: duração do complexo QRS; ST_seg: segmento ST; QT_int: intervalo QT; TP_seg: segmento TP; FC: frequência cardíaca.

A Figura 32 ilustra a relação entre a duração dos intervalos PR e QT, e do segmento TP, e o comprimento médio do ciclo cardíaco (intervalo RR), obtidos em registros na condição IT.

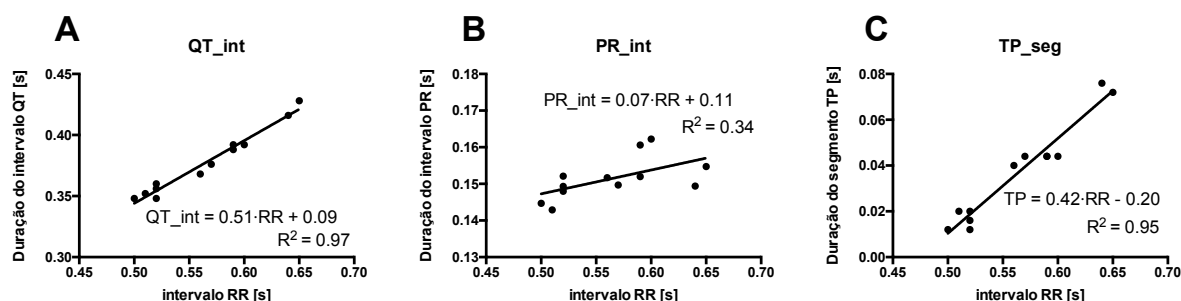


Figura 32 - Relação da duração dos intervalos e segmento com o comprimento médio do ciclo cardíaco (intervalo RR). Dados com regressão linear. A) duração do intervalo PR (n = 12); B) duração do intervalo QT (n = 12); C) duração do segmento TP (n = 12).

Como observado na Figura 32, houve uma relação linear positiva entre todos os parâmetros temporais do ECG analisados e o intervalo RR. Os coeficientes de correlação de Pearson foram 0,585 para o intervalo PR, 0,985 para o intervalo QT, e 0,973 para o segmento TP, indicativos de correlação positiva significativa ($p < 0,05$) em todos os casos.

5. Discussão

A instrumentação desenvolvida se mostrou adequada para registros de ECG na lagartixa, com boa relação sinal/ruído. A segunda versão da instrumentação apresentou faixa de frequência mais ampla com a passagem de componentes de baixa frequência, ocasionando menos distorções dos segmentos isoelétricos do ECG.

Foram obtidos registros de ECG da FC da lagartixa em três condições experimentais. De acordo com o nosso conhecimento, é a primeira vez que se tem a informação da FC neste animal. A observação do comportamento do animal no terrário foi fundamental para a aquisição do registro de ECG sem restrição física ou anestesia, dentro do próprio refúgio do animal, o que possibilitou a obtenção de dados do animal em estado próximo ao estado de repouso, sem a necessidade de manipulação.

O registro de MC se mostrou um método alternativo para obtenção da FC. A instrumentação foi baseada em um circuito simples e robusto, que permitiu registros, apesar de variações no posicionamento do sensor (LDR) e do laser na área sobre o coração. No entanto, esta imprecisão do posicionamento acarretou inconfiabilidade para caracterizações como a duração da diástole e sístole, de forma que o registro só pôde ser utilizado para estimar a FC.

5.1 ECG da lagartixa

A morfologia do ECG foi semelhante à encontrada em outros répteis (Hagensen et al., 2008; Liu and Li, 2005; Mullen, 1967; Zaar et al., 2004), com a presença das ondas P, QRS e T. Sabendo-se que o miocárdio de um escamado é esponjoso, e sem a presença anatomicamente identificável de um sistema condutor, esperava-se que a onda eletrocardiográfica referente à despolarização ventricular (complexo QRS) se assemelhasse àquela gerada pela despolarização atrial (onda P) em endotérmicos. Isto poderia ocorrer porque, devido à baixa velocidade de propagação da atividade elétrica no miocárdio, o vetor do coração teria magnitude pequena como consequência da existência, em um dado instante, de múltiplos dipolos com módulo pequeno e diferentes direções na frente de onda de despolarização. Porém, o complexo QRS mostrou-se relativamente rápido e com forma de espícula, indicando a provável existência de um caminho preferencial (isto

é, com maior velocidade de condução) de propagação da atividade elétrica no ventrículo.

O intervalo QRS médio na lagartixa foi 128 ms, o que corresponde a uma velocidade de propagação da onda de despolarização (VPOD) no ventrículo de 0,039 mm/ms, assumindo-se o comprimento ventricular como de 5 mm, enquanto que a VPOD no ventrículo humano é de ~0,75 mm/ms, para intervalo QRS médio de 100 ms (Rijnbeek et al., 2014) e comprimento ventricular de ~75 mm (Salton et al., 2002). Portanto, a VPOD no ventrículo da lagartixa corresponde a 5,2% da VPOD no ventrículo humano, confirmando a propagação consideravelmente mais lenta no primeiro. Isto se deve, provavelmente, à ausência de um sistema de rápida condução elétrica cardíaca (Jensen et al., 2014; Šolc, 2007). Ainda assim, a forma espicular do complexo QRS pode indicar que a propagação da onda de ativação elétrica se dê por uma via de maior velocidade relativa, que pode existir em decorrência de diferenças espaciais na concentração de canais de junção *gap*, na expressão de isoformas de conexina (como a presença de conexinas Cx40 (Jensen et al., 2012)), nas dimensões e/ou geometria celular, e nas dimensões do espaço intersticial (Spach et al., 2004).

Não foi observada a deflexão negativa da onda Q nos registros de ECG da lagartixa. Nos mamíferos, esta onda é formada durante a despolarização do septo ventricular a partir do ramo esquerdo de His, resultando em um vetor do coração com sentido esquerda-direita (Barr, 2010; Durrer et al., 1970; Thaler, 2013). No entanto, sendo o coração da lagartixa de pequena massa, a reduzida parcela ativada durante a fase inicial de despolarização do ventrículo pode ser insuficiente para gerar um vetor elétrico resultante detectável no registro de ECG. Este fato, associado à possível direção do eixo derivação ortogonalmente à suposta direção do vetor elétrico médio podem explicar a ausência da onda Q na derivação utilizada.

Apesar de os répteis não apresentarem septo completo e feixe de His, a onda Q foi observada em poucos registros na derivação I em lagartos de maior porte (Dawson, 1960; Dawson and Templeton, 1963; Liu and Li, 2005). Contudo, foram realizadas tentativas de registro de ECG na lagartixa nesta derivação, com eletrodos nas patas dianteiras, mas não houve identificação das ondas do ECG. É provável que isto se deva ao fato do eixo derivação ser ortogonal ao eixo maior do coração da

lagartixa, e à pequena massa cardíaca incapaz de gerar um vetor resultante com amplitude superior àquela do ruído.

Não é possível descrever o padrão espacial (vetocardiograma) da ativação elétrica do coração da lagartixa, pois foram feitos registros com apenas uma derivação. No entanto, conhecendo-se a polaridade dos eletrodos, é possível descrever o sentido resultante, a cada instante, da propagação da atividade elétrica no eixo derivação utilizado, que, no caso, é o mesmo do eixo anatômico maior do ventrículo. A presença de uma considerável deflexão positiva no início da despolarização ventricular (onda R) sugere que a onda despolarizante resultante seja orientada da base para o ápice do ventrículo, enquanto que a deflexão negativa que se segue (onda S) sugere posterior inversão do sentido resultante da propagação. Este padrão se assemelha à condução ventricular nos homeotérmicos (Šolc, 2007), em que a onda R corresponde à propagação pelo feixe de His presente no septo na direção base-ápice, e a onda S corresponde à propagação pelas fibras de Purkinje na região endocárdica nas direções endocárdio-epicárdio e ápice-base (Barr, 2010; Durrer et al., 1970; Ramanathan et al., 2006).

Estudos apontaram a presença de trabéculas endocárdicas que formam um caminho preferencial de condução do NAV ao ápice do ventrículo em testudíneos (Burggren, 1978), peixes e anfíbios adultos (Sedmera et al., 2003), e embriões de aves e mamíferos (durante fase de predominância do miocárdio esponjoso) (Rentschler et al., 2001; Sedmera et al., 2004; Virágh and Challice, 1977), o que poderia explicar a polaridade positiva no início da despolarização ventricular (da onda R), observada neste trabalho, enquanto que a polaridade negativa na sequência (onda S) pode ser explicada pela propagação da onda despolarizante pelo epicárdio, com sentido predominante ápice-base.

Observou-se que a polaridade de ambos o complexo QRS e da onda T é positiva na lagartixa. Este padrão é encontrado no ECG de humano e outros mamíferos em condições normais e é resultado de diferenças regionais na duração do PA em células no ventrículo (Gima and Rudy, 2002). Isto significa que as últimas regiões despolarizadas (epicárdio e base, onde o PA é mais curto) serão as primeiras a se repolarizar (Janse et al., 2012). Portanto, as semelhanças da polaridade do complexo QRS e da onda T na lagartixa sugerem que nesta espécie

as ondas de despolarização e repolarização também se deslocam em sentidos opostos.

É interessante observar o impacto que o padrão de propagação elétrica teria sobre o desenvolvimento da contração do coração que promove o bombeamento do sangue. A contração ventricular em mamíferos se inicia na região endocárdica apical, e progride em direção à base (Rushmer, 1955, 1964), onde estão localizados os grandes vasos arteriais, em um padrão complexo de ativação (Buckberg et al., 2008, 2006; Lorenz et al., 2000). Este padrão também seria esperado na lagartixa, já que o tronco arterial localiza-se na base do ventrículo. Como a contração é disparada pela ativação elétrica, é plausível supor que o ápice seja eletricamente ativado antes da base.

Quanto à relação dos segmentos e intervalos do ECG com a duração do intervalo RR médio, foi encontrada correlação positiva significativa em todos os parâmetros analisados.

O encurtamento do intervalo RR, ou seja, o aumento da FC, pode ocorrer como efeito de aumento do tônus regulatório simpático sobre o coração, o que causa aumento da frequência espontânea das células marcapasso sinoatriais e da velocidade de condução elétrica (Childers, 1977; Wang et al., 2001a). Como consequência destes efeitos, espera-se que haja encurtamento do período de repouso elétrico do coração (segmento TP) e do atraso da condução dos átrios para o ventrículo no CAV (segmento PR). O aumento da velocidade de condução pode ainda causar diminuição dos períodos em que há propagação da onda de despolarização no ventrículo (intervalo QT) e de despolarização atrial (onda P).

A correlação significativa desses parâmetros com a FC também é observada em outros vertebrados, como os lagartos *Eremias multiocellata* (Liu and Li, 2005) e *Gallotia galloti* (Porcell and González, 1986), ambos da família *Lacertidae*, e humanos (Malik et al., 2008; Schlamowitz, 1945a, 1945b, 1945c) (Figura 33).

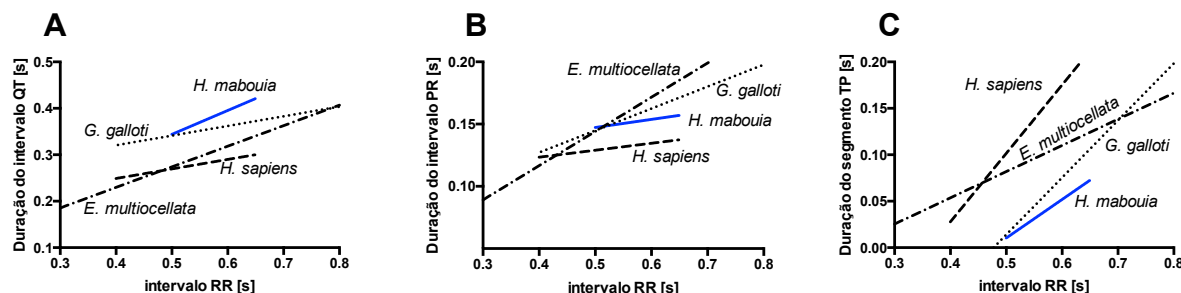


Figura 33 – Relação da duração dos intervalos PR(A) e QT (B), e segmento TP (C) com o intervalo RR médio nas espécies *Homo sapiens* (Schlamowitz, 1945a, 1945b, 1945c), *Eremias multiocellata* (Liu and Li, 2005), *Gallotia galloti* (Porcell and González, 1986) e *Hemidactylus mabouia* (dado deste trabalho).

Nota-se na Figura 33 que a relação do intervalo QT (Figura 33A) e do segmento TP (Figura 33C) com o intervalo R-R na lagartixa é semelhante àquela observada no lagarto *E. multiocellata*. Esta espécie é de pequeno porte (massa corporal média ~7 g; Liu and Li, 2005), e encontrada em região de clima semi-árido da Ásia e Leste Europeu. Em temperatura corporal de 25°C, a FC média deste animal foi de 1,67 Hz (Liu and Li, 2005), valor próximo ao da lagartixa.

A diferença da pequena variação do intervalo PR na lagartixa e humano em comparação com a grande variação nos lagartos *G. galloti* e *E. multiocellata* pode ser decorrente do protocolo experimental usado para as duas últimas espécies, que envolveu variação da temperatura corporal (de 5 a 35 °C), o que pode ter afetado a velocidade de condução elétrica no CAV (segmento PR) (Childers, 1977).

Todas as espécies apresentaram grande variação do segmento TP, que corresponde ao tempo de repouso elétrico. Este é dependente da frequência de excitação das células marcapasso que, por sua vez, é modulado pelo tônus simpático.

O intervalo QT compreende a despolarização ventricular (intervalo QRS), repolarização ventricular (onda T), e o intervalo entre o término da despolarização e início de repolarização (segmento ST). A inclinação da reta de cada componente do QT na lagartixa, corresponde a 0,13, -0,01 e 0,40, respectivamente. Portanto, os segmentos TP e ST apresentaram maior inclinação da reta, e correspondem, respectivamente, ao intervalo de repouso elétrico e tempo entre despolarização e repolarização ventricular. Sugere-se que a última pode ser decorrente do encurtamento do PA pelo aumento do tônus simpático (Terrenoire et al., 2005).

5.2 FC nas três condições experimentais

A FC na condição IM foi consideravelmente maior do que nas condições IT e SR, apesar das duas primeiras poderem induzir *stress* no animal, com a simulação de situações de risco. O *stress* é uma reação do organismo a situações de risco, a qual é caracterizada por alterações no tônus autonômico (i.e., tipicamente aumento da atividade simpática e redução do tônus parassimpático) e resposta neuroendócrina, com aumento da liberação de glicocorticóides (nos répteis, principalmente a corticosterona) (Silvestre, 2014). Como consequência da alteração do balanço autonômico eferente, há aumento da FC e da temperatura corporal (DiMicco et al., 2006; Porges, 1995; Wang et al., 2001a).

A imobilização da lagartixa na condição IM poderia ser considerada semelhante à situação de presa capturada pelo predador. Nesta condição, há rápida liberação de corticosterona da córtex adrenal (Silvestre, 2014), e diversos estudos relataram aumento de temperatura corporal e taquicardia na tartaruga (Cabanac and Bernieri, 2000), pato (Cabanac and Guillemette, 2001), rato (Cabanac and Cabanac, 2000; Cabanac and Dardashti, 1999) e lagarto (Cabanac and Cabanac, 2000; Cabanac and Gosselin, 1993). Esta reação é denominada febre emocional, e ocorre tanto em ectotérmicos, como em homeotérmicos (Briese, 1995; Cabanac and Dardashti, 1999; Cabanac and Gosselin, 1993).

Além do aumento da temperatura corporal, pode ter havido transferência de calor do experimentador para a lagartixa durante a manipulação do animal, uma vez que foi feita sua contenção manual. Ectotérmicos expostos a alta temperatura apresentam aumento da FC, devido alteração do tônus neural autonômico (Seebacher and Franklin, 2001), como também, pelo componente vasoativo prostaglandina (Seebacher and Franklin, 2003).

Apesar de a condição IT também induzir *stress* ao animal, a FC nesta condição foi significativamente menor do que em IM. No entanto, a imobilidade tônica está associada à reação da presa prestes a ser capturada pelo predador, ao se “fingir de morta” (Gallup *et al.*, 1980). Esta resposta reflexa é acionada quando o animal está em situação sem a possibilidade de escape (Alboni et al., 2008; Blanc et al., 2015), e alguns consideram que seja o último recurso de defesa (Gallup, 1974). Ela também é denominada hipnose por alguns autores, e a forma de induzir este estado no animal pela disposição corporal e/ou por estímulos varia entre as

espécies. Por exemplo, a disposição corporal pode ser em decúbito dorsal, como em lagartos (Hennig and Dunlap, 1978; Prestrude and Crawford, 1970), tubarão (Davie et al., 1993) e aves (Edelaar et al., 2012), ou em decúbito lateral, como em coelhos (Giannico et al., 2014). Além disso, pode-se aplicar estímulos, como imobilização manual por longo período, pressão, toque e queda, como realizado com isópodos (Quadros et al., 2012).

Em alguns animais, a variação da FC durante a IT é bifásica, ocorrendo inicialmente aumento da FC, seguido de diminuição (Giannico et al., 2014), conforme observado na lagartixa (Figura 25). Também podem ser observadas diminuições da frequência respiratória e da pressão sanguínea arterial (as quais podem indiretamente afetar FC), e modificações no eletroencefalograma e no ritmo cardíaco (Davie et al., 1993; Giannico et al., 2014; Klemm, 1971; Prestrude and Crawford, 1970). Sugere-se que o aumento de FC seguido de sua diminuição ocorra pela ativação sequencial das eferências simpática e parassimpática (Davie et al., 1993; Giannico et al., 2014; Prestrude and Crawford, 1970), e que a reação de “morte simulada” esteja associada ao aumento de atividade de fibras vagais (Porges, 2009; Porges et al., 2003; Shaffer and Venner, 2013).

Embora a IT apresente duas fases com o aumento da FC seguida de sua diminuição, a FC escolhida como representativa da lagartixa nesta condição foi aquela de menor valor, que, possivelmente, corresponde à segunda fase. Resultados prévios confirmaram a presença de acentuada resposta cronotrópica positiva e negativa a noradrenalina e acetilcolina, respectivamente, no coração isolado da lagartixa (Germer et al., 2015). Sugere-se que a alta FC durante a condição IM pode ter sido decorrência da predominância do tônus simpático (reação de *stress*) e do aumento da temperatura corporal, enquanto que a baixa FC durante a condição IT pode ter sido causada por aumento do tônus vagal, característico da fase tardia desta resposta.

É interessante observar que o posicionamento da lagartixa com a região dorsal do corpo virada para baixo é comum no animal em vida livre (por exemplo, quando o animal se locomove no teto). Portanto, parece que o decúbito dorsal *per se* não dispare o reflexo de imobilidade tônica, mas que o gatilho para este reflexo envolva a percepção de ameaça (e.g., manipulação do animal pelo experimentador).

5.3 CV nas três condições experimentais

O CV da série RRI indica a variabilidade da duração dos ciclos cardíacos, denominada variabilidade da frequência cardíaca (VFC). A FC é regulada pela eferência autonômica (simpática e parassimpática), que, por sua vez, é controlada por áreas específicas no bulbo, que integram informações sensoriais dos proprioceptores (posição dos membros), barorreceptores (pressão sanguínea), quimiorreceptores (pressões parciais de oxigênio e dióxido de carbono, e pH do sangue), entre outros (Shaffer and Venner, 2013; Vanderlei et al., 2009), além de entrada das áreas límbicas e vias sensoriais somáticas (visão, audição, olfato), as quais determinam a saída final para as eferências simpática e parassimpática (Porges, 1995). A VFC é tipicamente alta em mamíferos saudáveis e jovens, o que indica alto nível de atividade de todo o sistema envolvido na regulação autonômica do coração, particularmente resultando em um alto tônus parassimpático (Hedman et al., 1995), enquanto que a baixa VFC pode ser um indicador de baixa robustez do sistema regulatório como um todo (Casolo et al., 1989; Shaffer and Venner, 2013).

Estudos com ratos em situações indutoras de *stress* indicaram diminuição da VFC decorrente do aumento da atividade simpática (Grippio et al., 2002), também observada em lagarto (De Vera and González, 1999; De Vera et al., 2000), enquanto que o bloqueio parassimpático tende a diminuir a VFC (De Vera and González, 1997; De Vera et al., 2000). Frequentemente, as alterações de tônus simpático e parassimpático ocorrem de modo recíproco (e.g., aumento do tônus simpático acompanhado de diminuição do tônus parassimpático). O maior CV na condição SR pode indicar um controle tônico autonômico mais robusto da FC, com predominância vagal, característico da condição de hígidez e repouso do animal no seu refúgio. Por outro lado, a menor CV em IT e IM, condições que podem ser interpretadas pelo animal como representativas de ameaça, poderia indicar redução do tônus vagal, ou pelo menos do componente desta eferência associado à manutenção da VFC (Porges, 1995).

6. Conclusões

- De acordo com o nosso conhecimento, este estudo apresenta o primeiro relato de registro de ECG com determinação da FC em lagartixas, contribuindo com dados de répteis de pequeno porte escassos na literatura.
- Condições tipicamente associadas à indução de *stress* causaram redução da variabilidade do intervalo RR, independentemente da modificação de FC.
- Espera-se que a metodologia e instrumentação desenvolvidas possibilitem futuras medições fisiológicas e farmacológicas em animais minimamente submetidos a perturbação.

7. Referências

- Acharya, V. (2011). Improving common-mode rejection using the right-leg drive amplifier. *Texas Instruments* 1–11.
- Alboni, P., Alboni, M., and Bertorelle, G. (2008). The origin of vasovagal syncope: to protect the heart or to escape predation? *Clin. Auton. Res.* 18, 170–178.
- Almeida, J.C.M., Watanabe, R.H., Cohen, D.J., Levi D'Ancona, C.A., and Bassani, J.W.M. (2011). Instrumentation for minimally invasive measurement of vesical pressure in men. In *BIODEVICES 2011 - Proceedings of the International Conference on Biomedical Electronics and Devices*, (Roma), pp. 189–193.
- Barr, R.C. (2010). Genesis of the Electrocardiogram. In *Comprehensive Electrocardiology*, P.W. Macfarlane, A. van Oosterom, O. Pahlm, P. Kligfield, M. Janse, and J. Camm, eds. (Springer London), pp. 167–190.
- Bassani, R.A. (2006). Transient outward potassium current and Ca^{2+} homeostasis in the heart: beyond the action potential. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 39, 393–403.
- Bassani, R.A., and Bers, D.M. (1994). Na-Ca exchange is required for rest-decay but not for rest-potential of twitches in rabbit and rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26, 1335–1347.
- Bers, D.M., Bassani, R.A., Bassani, J.W.M., Baudet, S., and Hryshko, L. V (1993). Paradoxical twitch potentiation after rest in cardiac muscle: increased fractional release of SR calcium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 25, 1047–1057.
- Blanc, J.-J., Alboni, P., and Benditt, D.G. (2015). Vasovagal syncope in humans and protective reactions in animals. *Europace* 345–349.
- Blinks, J.R., and Koch-Weser, J. (1961). Analysis of the effects of changes in rate and rhythm upon myocardial contractility. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 134, 373–389.
- Briese, E. (1995). Emotional hyperthermia and performance in humans. *Physiol. Behav.* 58, 615–618.
- Buckberg, G., Hoffman, J.I.E., Mahajan, A., Saleh, S., and Coghlan, C. (2008). Cardiac mechanics revisited: The relationship of cardiac architecture to ventricular function. *Circulation* 118, 2571–2587.
- Buckberg, G.D., Schelbert, H., and Mahajan, A. (2006). Cardiac motion and fiber shortening: the whole and its parts. *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* 29, 145–149.
- Burggren, W. (1978). influence of intermittent breathing on ventricular depolarization patterns in chelonian reptiles. *J. Physiol.* 278, 349–364.
- Burns, T.A. (1971). Effect of temperature on heart and ventilatory rates of *Sceloporus jarovi*. *Southwest. Nat.* 15, 465–471.
- Cabanac, A.J., and Cabanac, M. (2000). Heart rate response to gentle handling of frog and lizard. *Behav. Processes* 52, 89–95.
- Cabanac, A.J., and Guillemette, M. (2001). Temperature and heart rate as stress indicators of handled common eider. *Physiol. Behav.* 74, 475–479.
- Cabanac, M., and Bernieri, C. (2000). Behavioral rise in body temperature and tachycardia by handling of a turtle (*Clemmys insculpta*). *Behav. Processes* 49, 61–68.
- Cabanac, M., and Dardashti, M. (1999). Emotional fever in rats persists after vagotomy. *Physiol. Behav.* 67, 347–350.
- Cabanac, M., and Gosselin, F. (1993). Emotional fever in the lizard *Callopiastes maculatus* (Teiidae). *Anim. Behav.* 46, 200–202.
- Casolo, G., Balli, E., Taddei, T., Amuhasi, J., and Gori, C. (1989). Decreased spontaneous heart rate variability in congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.* 64, 1162–1167.

- Cheng, D.K. (1989). *Field and Wave Electromagnetics* (Addison-Wesley).
- Childers, R. (1977). The AV node: normal and abnormal physiology. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 19, 361–384.
- Christoffels, V.M., and Moorman, A.F.M. (2009). Development of the cardiac conduction system why are some regions of the heart more arrhythmogenic than others? *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 2, 195–207.
- Christoffels, V.M., Smits, G.J., Kispert, A., and Moorman, A.F.M. (2010). Development of the pacemaker tissues of the heart. *Circ. Res.* 106, 240–254.
- Clark, T.D., and Farrell, A.P. (2011). Effects of body mass on physiological and anatomical parameters of mature salmon: evidence against a universal heart rate scaling exponent. *J. Exp. Biol.* 214, 887–893.
- Davie, P.S., Franklin, C.E., and Grigg, G.C. (1993). Blood pressure and heart rate during tonic immobility in the black tipped reef shark, *Carcharhinus melanoptera*. *Fish Physiol. Biochem.* 12, 95–100.
- Dawson, W.R. (1960). Physiological responses to temperature in the lizard *Eumeces obsoletus*. *Physiol. Zool.* 33, 87–103.
- Dawson, W.R., and Templeton, J.R. (1963). Physiological responses to temperature in the lizard *Crotaphytus collaris*. *Physiol. Zool.* 36, 219–236.
- DiMicco, J.A., Sarkar, S., Zaretskaia, M. V, and Zaretsky, D. V (2006). Stress-induced cardiac stimulation and fever: Common hypothalamic origins and brainstem mechanisms. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 126–127, 106–119.
- Durrer, D., van Dam, R.T., Freud, G.E., Janse, M.J., Meijler, F.L., and Arzbaecher, R.C. (1970). Total excitation of the isolated human heart. *Circulation* 41, 899–912.
- Edelaar, P., Serrano, D., Carrete, M., Blas, J., Potti, J., and Tella, J.L. (2012). Tonic immobility is a measure of boldness toward predators: An application of Bayesian structural equation modeling. *Behav. Ecol.* 23, 619–626.
- Einthoven, W., Fahr, G., and Waart, A. (1913). Über die Richtung und die manifeste Grösse der Potentialschwankungen im menschlichen Herzen und über den Einfluss der Herzlage auf die Form des Elektrokardiogramms. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 150, 275–315.
- Enok, S., Slay, C., Abe, A.S., Hicks, J.W., and Wang, T. (2014). Intraspecific scaling of arterial blood pressure in the Burmese python. *J. Exp. Biol.* 217, 2232–2234.
- Farrell, A.P. (1991). Cardiac scope in lower vertebrates. *Can. J. Zool.* 69, 1981–1984.
- Galli, G.L.J., Skovgaard, N., Abe, A.S., Taylor, E.W., and Wang, T. (2007). The adrenergic regulation of the cardiovascular system in the South American rattlesnake, *Crotalus durissus*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 148, 510–520.
- Gallup, G.G. (1974). Animal hypnosis: factual status of a fictional concept. *Psychol. Bull.* 81, 836–853.
- Gallup, G.G., Boren, J.L., Suarez, S.D., Wallnau, L.B., and Gagliardi, G.J. (1980). Evidence for the integrity of central processing during tonic immobility. *Physiol. Behav.* 25, 189–194.
- Germer, C.M., Tomaz, J.M., Carvalho, A.F., Bassani, R.A., and Bassani, J.W.M. (2015). Electrocardiogram, heart movement and heart rate in the awake gecko (*Hemidactylus mabouia*). *J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 185, 111–118.
- Giannico, A.T., Lima, L., Lange, R.R., Froes, T.R., and Montiani-Ferreira, F. (2014). Proven cardiac changes during death-feigning (tonic immobility) in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 200, 305–310.
- Gima, K., and Rudy, Y. (2002). Ionic current basis of electrocardiographic waveforms: A model study. *Circ. Res.* 90, 889–896.
- Gobet, C.-A., and Knob, A. (1983). Noise analysis of switched capacitor networks. *IEEE*

Trans. Circuits Syst. 30, 37–43.

Gregg, R.E., Zhou, S.H., Lindauer, J.M., Helfenbein, E.D., and Giuliano, K.K. (2008). What is inside the electrocardiograph? J. Electrocardiol. 41, 8–14.

Grippo, A.J., Moffitt, J.A., and Johnson, A.K. (2002). Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 282, R1333–R1341.

Guyton, A.C., and Hall, J.E. (2006). O Coração. In Tratado de Fisiologia Médica, (Rio de Janeiro: Saunders, Elsevier),.

Hagensen, M.K., Abe, A.S., Falk, E., and Wang, T. (2008). Physiological importance of the coronary arterial blood supply to the rattlesnake heart. J. Exp. Biol. 211, 3588–3593.

Hampton, J.R. (2013). What the ECG is about. In The ECG Made Easy, (Churchill Livingstone), p. 208.

Hedman, A.E., Hartikainen, J.E., Tahvanainen, K.U., and Hakumäki, M.O. (1995). The high frequency component of heart rate variability reflects cardiac parasympathetic modulation rather than parasympathetic “tone”. Acta Physiol. Scand. 155, 267–273.

Hennig, C.W., and Dunlap, W.P. (1978). Tonic immobility in *Anolis carolinensis*: Effects of time and conditions of captivity. Behav. Biol. 23, 75–86.

Hicks, J.W. (1994). Adrenergic and cholinergic regulation of intracardiac shunting. Physiol. Zool. 67, 1325–1346.

Horáček, B.M. (2010). Lead Theory. In Comprehensive Electrocardiology, P.W. Macfarlane, A. van Oosterom, O. Pahlm, P. Kligfield, M. Janse, and J. Camm, eds. (Springer London), pp. 291–314.

Hove-Madsen, L., and Gesser, H. (1989). Force frequency relation in the myocardium of rainbow trout. J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol. 159, 61–69.

Janse, M.J., Coronel, R., Opthof, T., Sosunov, E. a., Anyukhovskiy, E.P., and Rosen, M.R. (2012). Repolarization gradients in the intact heart: Transmural or apico-basal? Prog. Biophys. Mol. Biol. 109, 6–15.

Jansen, J.A., van Veen, T.A.B., de Bakker, J.M.T., and van Rijen, H.V.M. (2010). Cardiac connexins and impulse propagation. J. Mol. Cell. Cardiol. 48, 76–82.

Jensen, B., Boukens, B.J.D., Postma, A. V, Gunst, Q.D., van den Hoff, M.J.B., Moorman, A.F.M., Wang, T., and Christoffels, V.M. (2012). Identifying the evolutionary building blocks of the cardiac conduction system. PLoS ONE 7, 1–13.

Jensen, B., van den Berg, G., van den Doel, R., Oostra, R.-J., Wang, T., and Moorman, A.F.M. (2013a). Development of the hearts of lizards and snakes and perspectives to cardiac evolution. PLoS ONE 8, e63651.

Jensen, B., Wang, T., Christoffels, V.M., and Moorman, A.F.M. (2013b). Evolution and development of the building plan of the vertebrate heart. Biochim. Biophys. Acta 1833, 783–794.

Jensen, B., Moorman, A.F.M., and Wang, T. (2014). Structure and function of the hearts of lizards and snakes. Biol. Rev. 89, 302–336.

Kléber, A.G., and Rudy, Y. (2004). Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. Physiol. Rev. 84, 431–488.

Klemm, W.R. (1971). Neurophysiologic studies of the immobility reflex (“animal hypnosis”). Neurosci. Res. 4, 165–212.

Lillywhite, H.B., Zippel, K.C., and Farrell, A.P. (1999). Resting and maximal heart rates in ectothermic vertebrates. Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol. 124, 369–382.

Lindstedt, S.L., and Schaeffer, P.J. (2002). Use of allometry in predicting anatomical and physiological parameters of mammals. Lab. Anim. 36, 1–19.

- Liu, C., and Li, R. (2005). Electrocardiogram and heart rate in response to temperature acclimation in three representative vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 142, 416–421.
- Lorenz, C.H., Pastorek, J.S., and Bundy, J.M. (2000). Delineation of normal human left ventricular twist throughout systole by tagged cine magnetic resonance imaging. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* 2, 97–108.
- Maier, L.S., Bers, D.M., and Pieske, B. (2000). Differences in Ca^{2+} -handling and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -content in isolated rat and rabbit myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32, 2249–2258.
- Malik, M., Hnatkova, K., Sisakova, M., and Schmidt, G. (2008). Subject-specific heart rate dependency of electrocardiographic QT, PQ, and QRS intervals. *J. Electrocardiol.* 41, 491–497.
- Malmivuo, J., and Plonsey, R. (1995). *Bioelectromagnetism: Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields* (New York: Oxford University Press).
- Meens, M.J., Kwak, B.R., and Duffy, H.S. (2015). Role of connexins and pannexins in cardiovascular physiology. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 2779–2792.
- Moorman, A.F.M., and Christoffels, V.M. (2003). Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol. Rev.* 83, 1223–1267.
- Mullen, R.K. (1967). Comparative electrocardiography of the Squamata. *Physiol. Zool.* 40, 114–126.
- Nielsen, J.S., and Gesser, H. (2001). Effects of high extracellular $[\text{K}^+]$ and adrenaline on force development, relaxation and membrane potential in cardiac muscle from freshwater turtle and rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 204, 261–268.
- Plonsey, R. (1977). Action potential sources and their volume conductor fields. *Proc. IEEE* 65, 601–611.
- Plonsey, R., and Barr, R.C. (2007a). Extracellular Fields. In *Bioelectricity: A Quantitative Approach*, (New York: Springer Science & Business Media), pp. 223–265.
- Plonsey, R., and Barr, R.C. (2007b). Cardiac Electrophysiology. In *Bioelectricity: A Quantitative Approach*, (Springer Science & Business Media), pp. 267–323.
- Porcell, L.D.V., and González, J.G. (1986). Cardiac responses to temperature in the lizard *Gallotia galloti*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 85, 389–394.
- Porges, S.W. (1995). Cardiac vagal tone: A physiological index of stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 19, 225–233.
- Porges, S.W. (2009). The polyvagal theory: New insights into adaptive reactions of the autonomic nervous system. *Cleve. Clin. J. Med.* 76, S86–S90.
- Porges, S.W., Riniolo, T.C., McBride, T., and Campbell, B. (2003). Heart rate and respiration in reptiles: Contrasts between a sit-and-wait predator and an intensive forager. *Brain Cogn.* 52, 88–96.
- Prestrude, A.M., and Crawford, F.T. (1970). Tonic immobility in the lizard, *Iguana iguana*. *Anim. Behav.* 18, 391–395.
- Quadros, A.F., Bugs, P.S., and Araujo, P.B. (2012). Tonic immobility in terrestrial isopods: Intraspecific and interspecific variability. *Zookeys* 176, 155–170.
- Ramanathan, C., Jia, P., Ghanem, R., Ryu, K., and Rudy, Y. (2006). Activation and repolarization of the normal human heart under complete physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 6309–6314.
- Rentschler, S., Vaidya, D.M., Tamaddon, H., Degenhardt, K., Sassoon, D., Morley, G.E., Jalife, J., and Fishman, G.I. (2001). Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. *Development* 128, 1785–1792.
- Rijnbeek, P.R., van Herpen, G., Bots, M.L., Man, S., Verweij, N., Hofman, A., Hillege, H., Numans, M.E., Swenne, C. a, Witteman, J.C.M., et al. (2014). Normal values of the electrocardiogram

for ages 16-90 years. *J. Electrocardiol.* 47, 914–921.

Rushmer, R.F. (1955). Initial Phase of Ventricular Systole: Asynchronous Contraction. *Am J Physiol -- Leg. Content* 184, 188–194.

Rushmer, R.F. (1964). Initial ventricular impulse. *Circulation* 29, 268–283.

Salton, C.J., Chuang, M.L., O'Donnell, C.J., Kupka, M.J., Larson, M.G., Kissinger, K. V., Edelman, R.R., Levy, D., and Manning, W.J. (2002). Gender differences and normal left ventricular anatomy in an adult population free of hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39, 1055–1060.

Sartori, M.R., Leite, C.A.C., Abe, A.S., Crossley, D.A., and Taylor, E.W. (2015). The progressive onset of cholinergic and adrenergic control of heart rate during development in the green iguana, *Iguana iguana*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 188, 1–8.

Schlamowitz, I. (1945a). An analysis of the time relationships within the cardiac cycle in electrocardiograms of normal men. III The duration of the PR interval and its relationship to the cycle length (RR interval). *Am. Heart J.* 31, 473–476.

Schlamowitz, I. (1945b). An analysis of the time relationships within the cardiac cycle in electrocardiograms of normal men. I The duration of the QT interval and its relationship to the cycle length (RR interval). *Am. Heart J.* 1464, 329–342.

Schlamowitz, I. (1945c). An analysis of the time relationships within the cardiac cycle in electrocardiograms of normal men. II The duration of the TP interval and its relationship to the cycle length (RR interval). *Am. Heart J.* 464–472.

Sedmera, D., Reckova, M., DeAlmeida, A., Sedmerova, M., Biermann, M., Volejnik, J., Sarre, A., Raddatz, E., McCarthy, R.A., Gourdie, R.G., et al. (2003). Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in zebrafish and *Xenopus* hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284, H1152–H1160.

Sedmera, D., Reckova, M., Bigelow, M.R., Dealmeida, A., Stanley, C.P., Mikawa, T., Gourdie, R.G., and Thompson, R.P. (2004). Developmental transitions in electrical activation patterns in chick embryonic heart. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 280, 1001–1009.

Seebacher, F., and Franklin, C.E. (2001). Control of heart rate during thermoregulation in the heliothermic lizard *Pogona barbata*: importance of cholinergic and adrenergic mechanisms. *J. Exp. Biol.* 204, 4361–4366.

Seebacher, F., and Franklin, C.E. (2003). Prostaglandins are important in thermoregulation of a reptile (*Pogona vitticeps*). *Proc. Biol. Sci.* 270 Suppl, S50–S53.

Shaffer, F., and Venner, J. (2013). Heart Rate Variability Anatomy and Physiology. *Biofeedback* 41, 13–25.

Shiels, H.A., Vornanen, M., and Farrell, A.P. (2002). The force-frequency relationship in fish hearts - A review. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 132, 811–826.

Silverthorn, D.U. (2010). Fisiologia Cardiovascular. In *Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada*, (Porto Alegre: Artmed), p. 992.

Silvestre, A.M. (2014). How to assess stress in reptiles. *J. Exot. Pet Med.* 23, 240–243.

Šolc, D. (2007). The heart and heart conducting system in the kingdom of animals: a comparative approach to its evolution. *Exp. Clin. Cardiol.* 12, 113–118.

Spach, M.S., Heidlage, J.F., Barr, R.C., and Dolber, P.C. (2004). Cell size and communication: Role in structural and electrical development and remodeling of the heart. *Heart Rhythm* 4, 500–515.

Taylor, E.W., Leite, C.A.C., Sartori, M.R., Wang, T., Abe, A.S., and Crossley, D.A. (2014). The phylogeny and ontogeny of autonomic control of the heart and cardiorespiratory interactions in vertebrates. *J. Exp. Biol.* 217, 690–703.

Temple, I.P., Inada, S., Dobrzynski, H., and Boyett, M.R. (2013). Connexins and the atrioventricular node. *Heart Rhythm* 10, 297–304.

- Terrenoire, C., Clancy, C.E., Cormier, J.W., Sampson, K.J., and Kass, R.S. (2005). Autonomic control of cardiac action potentials: role of potassium channel kinetics in response to sympathetic stimulation. *Circ. Res.* 96, e25–e34.
- Thaler, M.S. (2013). *ECG Essencial: Eletrocardiograma na Prática Diária* (Artmed).
- Truex, R.C., and Smythe, M.Q. (1965). Comparative morphology of the cardiac conduction tissue in animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 127, 19–33.
- Vanderlei, L.C.M., Pastre, C.M., Hoshi, R.A., Carvalho, T.D. De, and Godoy, M.F. De (2009). Basic notions of heart rate variability and its clinical applicability. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.* 24, 205–217.
- De Vera, L., and González, J.G. (1997). Power spectral analysis of short-term RR interval and arterial blood pressure oscillations in lizard (*Gallotia galloti*): Effects of parasympathetic blockade. *J. Exp. Zool.* 118, 671–678.
- De Vera, L., and González, J.G. (1999). Power spectral analysis of short-term RR interval and arterial blood pressure oscillations in the lizard, *Gallotia galloti*: Effects of sympathetic blockade. *J. Exp. Zool.* 283, 113–120.
- De Vera, L., González, J.G., and Pereda, E. (2000). Relationship between cortical electrical and cardiac autonomic activities in the awake lizard, *Gallotia galloti*. *J. Exp. Zool.* 287, 21–28.
- Virágh, S., and Challice, C.E. (1977). The development of the conduction system in the mouse embryo heart. I. The first embryonic A-V conduction pathway. *Dev. Biol.* 56, 382–396.
- Wang, T., Warburton, S., Abe, A.S., and Taylor, T. (2001a). Vagal control of heart rate and cardiac shunts in reptiles: Relation to metabolic state. *Physiol. Soc. Symp.* 86, 777–784.
- Wang, T., Taylor, E.W., Andrade, D., and Abe, A.S. (2001b). Autonomic control of heart rate during forced activity and digestion in the snake *Boa constrictor*. *J. Exp. Biol.* 204, 3553–3560.
- Wang, T., Altimiras, J., Klein, W., and Axelsson, M. (2003). Ventricular haemodynamics in *Python molurus*: separation of pulmonary and systemic pressures. *J. Exp. Biol.* 206, 4241–4245.
- Warren, D.E., Galli, G.L.J., Patrick, S.M., and Shiels, H.A. (2010). The cellular force-frequency response in ventricular myocytes from the varanid lizard, *Varanus exanthematicus*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298, R567–R574.
- Webster, J.G. (2006). Basic Instrumentation to Record ECG Signals. In *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*, (Wiley), p. 634.
- Webster, J.G. (2009). *Medical instrumentation Application and Design* (Wiley).
- Weiss, J.N. (1997). Ion Channels in Cardiac Muscle. In *The Myocardium*, G.A. Langer, ed. (Academic Press), pp. 81–142.
- West, G.B., Brown, J.H., and Enquist, B.J. (1997). A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. *Science* 276, 122–126.
- White, C.R., Phillips, N.F., and Seymour, R.S. (2006). The scaling and temperature dependence of vertebrate metabolism. *Biol. Lett.* 2, 125–127.
- Wyneken, J. (2009). Normal reptile heart morphology and function. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 12, 51–63.
- Yackzan, K.S., Yousef, M.K., and Dill, D.B. (1972). Comparative electrocardiography in lizards: Effects of temperature and *Gymnema sylvestre* fractions. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 43, 381–391.
- Zaar, M., Larsen, E., and Wang, T. (2004). Hysteresis of heart rate and heat exchange of fasting and postprandial savannah monitor lizards (*Varanus exanthematicus*). *Biochem. Physiol. Part A* 137, 675–682.
- Zaar, M., Overgaard, J., Gesser, H., and Wang, T. (2007). Contractile properties of the functionally divided python heart: Two sides of the same matter. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 146, 163–173.

8. Autorizações



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "**Medição da frequência cardíaca na lagartixa (*Hemidactylus mabouia*)**" (protocolo nº **2331-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. José W.M. Bassani / Carina Marconi Germer**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **21 de fevereiro de 2011**.

Campinas, 21 de fevereiro de 2011.

Profa. Dra. Ana-Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Frequência cardíaca e transporte de cálcio no coração da lagartixa (Hemidactylus mabouia, Moreau de Jonnés, 1818)" (protocolo nº 3283-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani / Carina Marconi Germer, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 27 de fevereiro de 2014.

Campinas, 27 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Frequência cardíaca e transporte de cálcio no coração da lagartixa (Hemidactylus mabouia, Moreau de Jonnès, 1818)." (protocolo nº 3657-1), sob a responsabilidade de José Wilson Magalhães Bassani / Carina Marconi Germer, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 15 de dezembro de 2014.

Campinas, 15 de dezembro de 2014.



Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14566-6	Data da Emissão: 23/01/2014 16:45	Data para Revalidação*: 22/02/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: José Wilson Magalhães Bassani	CPF: 776.113.738-20
Título do Projeto: Acoplamento excitação-contração no coração da lagartixa (Hemidactylus mabouia (Moreau de Jonnés, 1818): desenvolvimento de métodos e pesquisa básica	
Nome da Instituição : Universidade Estadual de Campinas	CNPJ: 46.068.425/0001-33

6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
9	As atividades contempladas nesta autorização NAO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Outras ressalvas

1	Para o sacrifício dos exemplares SUGERIMOS a utilização dos métodos recomendados pela RESOLUÇÃO 714/2002-CFMV e/ou da American Society of Ichthyologist and Herpetologist. Guidelines for Use of Live Amphibians and Reptiles in Field and Laboratory Research (Ash, 2004).
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Elizângela Souto de Oliveira	Bióloga	223.210.878-38	342031478 SSP-SP	Brasileira
2	Sonia Cano Montebelo Rachel	Medica Veterinária	081.318.508-46	10406416-X SSP-SP-SP	Brasileira
3	Rosana Almada Bassani	Pesquisadora	282.299.676-87	14104025 SSP-SP	Brasileira
4	Carina Marconi Germer	Estudante	382.637.888-11	47081896-7 ssp-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CAMPINAS	SP	Barão Geraldo de Rezende	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Hemidactylus mabouia
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Hemidactylus mabouia (*Qtde: 35)
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Hemidactylus mabouia

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Répteis)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
---	------------------------------------	---

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Estadual de Campinas	Manutenção temporária para pesquisa

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 82469719



Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14566-6	Data da Emissão: 23/01/2014 16:45	Data para Revalidação*: 22/02/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: José Wilson Magalhães Bassani	CPF: 776.113.738-20
Título do Projeto: Acoplamento excitação-contração no coração da lagartixa (<i>Hemidactylus mabouia</i> (Moreau de Jonnès, 1818): desenvolvimento de métodos e pesquisa básica	
Nome da Instituição : Universidade Estadual de Campinas	CNPJ: 46.068.425/0001-33

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 82469719



Página 4/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14566-7	Data da Emissão: 10/02/2015 14:15	Data para Revalidação*: 11/03/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: José Wilson Magalhães Bassani	CPF: 776.113.738-20
Título do Projeto: Acoplamento excitação-contração no coração da lagartixa (<i>Hemidactylus mabouia</i> (Moreau de Jonnés, 1818): desenvolvimento de métodos e pesquisa básica	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Outras ressalvas

1	Para o sacrifício dos exemplares SUGERIMOS a utilização dos métodos recomendados pela RESOLUÇÃO 714/2002-CFMV e/ou da American Society of Ichthyologist and Herpetologist. Guidelines for Use of Live Amphibians and Reptiles in Field and Laboratory Research (Ash, 2004).
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Elizângela Souto de Oliveira	Bióloga	223.210.878-38	342031478 SSP-SP	Brasileira
2	Sonia Cano Montebelo Rachel	Médica Veterinária	081.318.508-46	10406416-X SSP-SP-SP	Brasileira
3	Rosana Almada Bassani	Pesquisadora	282.299.676-87	14104025 SSP-SP	Brasileira
4	Carina Marconi Germer	Estudante	382.637.888-11	47081896-7 ssp-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CAMPINAS	SP	Barão Geraldo de Rezende	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Hemidactylus mabouia
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Hemidactylus mabouia ("Qtde: 35")
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Hemidactylus mabouia

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Répteis)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
---	------------------------------------	---

Destino do material biológico coletado

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 92763155



Página 2/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14566-7	Data da Emissão: 10/02/2015 14:15	Data para Revalidação*: 11/03/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: José Wilson Magalhães Bassani	CPF: 776.113.738-20
Título do Projeto: Acomplamento excitação-contracção no coração da lagartixa (<i>Hemidactylus mabouia</i> (Moreau de Jonnés, 1818): desenvolvimento de métodos e pesquisa básica	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 92763155



Página 5/5

9. Lista de Publicações

Germer, C.M., Bassani, J.W.M. (2010). Medição de eletrocardiograma em pequenos animais. In XVIII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, 2010, Campinas.

Germer, C.M., Bassani, J.W.M. (2011). Medição da frequência cardíaca da lagartixa (*Hemidactylus mabouia*). In XIX Congresso Interno de Iniciação Científica UNICAMP, 2011, Campinas.

Germer, C.M., Bassani, R.A., and Bassani, J.W.M. (2011). Electrocardiogram morphology, heart rate and heart movement in the non-anesthetized gecko. In XXVI Reunião Anual Da FeSBE. Livro de Resumos (Resumo 06.017).

Germer, C.M., Bassani, R.A., and Bassani, J.W.M. (2012). Método para determinação do ECG em um réptil de pequena massa corporal. In XXIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica - XXIII CBEB, (Porto de Galinhas - PB), pp. 2185–2188.

Germer, C.M., Tomaz, J.M., Carvalho, A.F., Bassani, R.A., and Bassani, J.W.M. (2015). Electrocardiogram, heart movement and heart rate in the awake gecko (*Hemidactylus mabouia*). J. Comp. Physiol. B. 185, 111–118.